

T H E S E

présentée devant l'Université de NANCY I

pour obtenir le grade de

D O C T E U R - I N G E N I E U R

par

Bernard ROVEL

Ingénieur E.S.B.M.B.A.

S U J E T

Etude de la perméation du cuivre chez un champignon filamenteux :

Aspergillus niger

Soutenue le 8 Juillet 1974 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. le Professeur GAY

Examineurs : M. le Professeur METCHE

M. DOMMERGUES, Directeur de Recherches CNRS

M. BONALY, Maître de Conférences Agrégé



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547402_0032

UNIVERSITE DE NANCY I

(N° C.N.R.S. : AO 9428)

U.E.R. Physique, Chimie, Biologie

T H E S E

présentée devant l'Université de NANCY I

pour obtenir le grade de

D O C T E U R - I N G E N I E U R

par

Bernard ROVEL

Ingénieur E.S.B.M.B.A.

S U J E T

Etude de la perméation du cuivre chez un champignon filamenteux :

Aspergillus niger

Soutenue le 8 Juillet 1974 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président : M. le Professeur GAY

Examineurs : M. le Professeur METCHE

M. DOMMERGUES, Directeur de Recherches CNRS

M. BONALY, Maître de Conférences Agrégé



Ce travail a été effectué au laboratoire de Biochimie
Appliquée de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des
Industries Alimentaires, 1 Rue Granville 54000 NANCY, sous la
direction de Monsieur le Professeur M. METCHE.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur GAY

Professeur de Chimie Biologique

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur METCHE

Professeur de Biochimie Appliquée

Monsieur DOMMERGUES

Directeur de Recherches
Centre de Pédologie du CNRS

Monsieur BONALY

Maître de Conférence Agrégé de Biochimie

A TOUS NOS MAITRES

De l'Ecole de Brasserie de Nancy

A NOTRE FAMILLE

A NOS AMIS

Nous tenons à remercier pour leur aide et leur collaboration

Monsieur LAMARCHE, Professeur de Pharmacologie
(UER Médecine A - NANCY)

Monsieur SOUCHIER, Maître de Recherches
(Centre de Pédologie du CNRS - Vandoeuvre-lès-Nancy)

Monsieur THIERRY, Assistant
(ENSAIA - NANCY)

Monsieur PARMENTIER et tout le personnel enseignant,
étudiant, technique et de service du laboratoire de
Biochimie Appliquée de l'ENSAIA dirigé par Monsieur
le Professeur METCHE.

Que tous ceux qui nous ont aidés à réaliser ce travail ou
qui y ont participé, trouvent ici nos plus vifs remerciements.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
BUT DE NOTRE TRAVAIL	12
MATERIEL ET METHODES	14
I - Le microorganisme	14
II - Milieu de culture	15
III - Ensemencement et cultures	16
IV - Dosage du glucose	17
V - Etude de la croissance d' <u>A.niger</u>	20
VI - Etude respirométrique	21
VII - Extraction et identification des acides carboxyliques	25
VIII - Extraction des mitochondries d' <u>A.niger</u>	29
IX - Extraction et mesure de l'activité des ATPases membranaires	30
X - Dosage du cuivre	32
XI - Préparation des complexes thréonine-cuivre	33
XII - Mesure de la radioactivité	34
XIII - Etude cinétique	36
RESULTATS	39
I - Influence de la concentration en cuivre sur la croissance d' <u>A.niger</u>	39
I-1. Etude détaillée des courbes du premier groupe	48
I-2. Etude détaillée des courbes du deuxième groupe	49
I-3. Cas de la courbe n°3	50
II - Etude cinétique de la fixation du cuivre par le mycélium	51
II-1. Etude de la fixation du cuivre sous forme Cu^{++} par le mycélium.	51
II-2. Pénétration du cuivre, sous forme chélatée, dans le mycélium..	57
II-3. EXsorption du cuivre	68
III - Etudes des relations existants entre le transport du cuivre et l'activité métabolique du mycélium	
III-1. Etude respirométrique	
III-2. Influence du cuivre sur l'utilisation du glucose	86
III-3. Relation entre la pénétration du cuivre dans le mycélium et l'activité ATPasique membranaire	89
DISCUSSION et CONCLUSION	97
BIBLIOGRAPHIE	102

I N T R O D U C T I O N

Le rôle essentiel du cuivre, en tant qu'oligoélément, sur le métabolisme d'Aspergillus niger a été mis en évidence depuis de nombreuses années (STEINBERG (1)- LILLY (2)).

L'absence totale de cuivre dans les milieux de croissance entraîne une diminution notable du développement du champignon (LAVOLLAY (3)).

NICHOLAS (1952) a pu montrer que la croissance d'A.niger est proportionnelle, dans certaines limites, à la concentration en cuivre du milieu. De nombreux auteurs notent de plus que la coloration des spores d'A.niger passe du jaune au brun puis au noir quand la concentration en cuivre augmente. On a même utilisé ce champignon en culture sur boîtes de Petri pour doser de faibles quantités de cuivre (4).

Par ailleurs on sait que le cuivre joue un rôle important dans certains systèmes enzymatiques isolés des champignons (2). En particulier, il entre de façon constitutive dans la composition d'un certain nombre d'enzymes comme les nitrites et hyponitrites-réductases, les polyphénol-oxydases, la tyrosinase (5) et la laccase (6).

Cependant le cuivre est connu aussi pour ses propriétés fongicides (7); ce qui lui vaut d'être utilisé dans la préparation de la "bouillie bordelaise", suspension colloïdale de sulfate de cuivre et d'hydroxyde de calcium. On notera de plus, que le cuivre et le soufre représentent encore de nos jours plus de 80% en poids des fongicides utilisés en agriculture.

Au niveau de la cellule, dans le cas des organismes supérieurs du règne animal, le cuivre est à l'origine de diverses manifestations

tendant à modifier la diffusion facilitée du glycérol dans les érythrocytes (8), les cellules de Schwann (8) et les membranes des axones (9).

Quand du sulfate de cuivre ($10^{-5}M$) est ajouté à la solution de Ringer baignant la surface extérieure de la peau de l'abdomen de grenouille, la perméabilité aux ions Cl^{-} est considérablement réduite (10). De même, dans les neurones de mollusques, le cuivre entraîne une inhibition importante de la perméabilité (environ 80%) (11).

D'autres observations tendent à montrer que le cuivre (Cu^{2+}) provoque le gonflement des mitochondries (12).

L'origine de l'action convulsivante du cuivre observée chez le pigeon après injection sous arachnoïdienne semble se localiser au niveau de la membrane plasmique des cellules du cerveau (13).

C'est ainsi que BOWLER et DUNCAN (14-15) ont suggéré que les enzymes membranaires et en particulier les différentes ATPases, sont directement impliquées dans le passage des ions au travers de la membrane cellulaire.

Le rôle inhibiteur du cuivre a également été mis en évidence chez les champignons; BARFIELD (16) a pu récemment montrer que le cuivre inhibait le transport des sulfates chez les champignons filamenteux.

Paradoxalement A.niger est amené à se développer en présence de quantités importantes de cuivre; ainsi au laboratoire nous avons réalisé des cultures de souches non adaptées sur des milieux contenant jusqu'à 700 mg de cuivre par litre, sous forme de sulfate (17-18). De plus JURKOWSKA (19) a pu adapter, après un certain nombre de repiquages, une souche d'A.niger à un milieu saturé en sulfate de cuivre.

SCHWEIGER (20) a souligné l'importance et les rôles respectifs

des ions Cu^{2+} et Fe^{2+} lors de la fermentation citrique. D'après cet auteur, les ions Fe^{2+} bloquent la fermentation tandis que les ions Cu^{2+} sont à la fois capables de lever cette inhibition et d'accélérer la production d'acide citrique.

Ce comportement "anormal" du cuivre, vis à vis d'A.niger, pourrait s'expliquer, soit par l'existence de sites de fixation intracellulaire soit plus simplement par l'absence de tout transport à l'intérieur de la cellule. Cette dernière hypothèse doit cependant être abandonnée. En effet, contrairement à ce qu'a montré ANTOINE (21) dans le cas des levures (Saccharomyces cerevisiae et Saccharomyces ellipsoideus) chez qui l'utilisation directe du glucose est rapidement inhibée par les ions Cu^{2+} , chez A.niger il a été démontré (17) qu'en présence de cuivre la consommation en glucose est accrue par rapport au témoin sans cuivre. D'autre part le métabolisme des acides carboxyliques est influencé par la teneur en ions cuivriques du milieu de culture ce qui implique une intervention directe du cuivre au niveau du métabolisme intracellulaire et du transport du cuivre à l'intérieur de la cellule.

KOTYK (22) pense lui-aussi que cet élément intervient seulement dans le métabolisme du glucose chez Saccharomyces cerevisiae R XII et que le transport du sucre dans la cellule n'est pas affecté pendant une période d'au moins 60 minutes après l'addition du cuivre.

Toutes ces considérations nous amènent à définir plus en détail ce qu'on appelle "transport d'un substrat". On entend par là le plus souvent le passage de molécules au travers de la membrane cellulaire.

Dans le cas de la cellule végétale la barrière qui sépare le milieu extérieur et les compartiments internes est de nature complexe. En effet les molécules transportées se heurtent tout d'abord à une paroi de nature cellulosique rigide et de structure fibrillaire. Cette

paroi ne semble pas jouer un rôle important dans la pénétration des substances à l'intérieur de la cellule. C'est en fait à la membrane cytoplasmique que revient ce rôle de barrière. Elle est spécifiquement perméable et certains de ses éléments fonctionnent de manière active pour prélever les substances du milieu. D'après GRENSON (23) " la membrane cytoplasmique doit posséder des caractéristiques tout à fait exceptionnelles qui en font un véritable organe de la cellule".

Grâce aux considérations cinétiques, on a pu classer schématiquement les phénomènes de perméabilité en trois types. Une molécule peut, en effet, pénétrer à l'intérieur d'une cellule soit par diffusion simple, soit par diffusion facilitée, soit encore par transport actif.

Rappelons brièvement les caractéristiques essentielles de chacun de ces processus (24).

I . Diffusion simple

La vitesse d'échange est une fonction de la surface de contact, de l'épaisseur de la membrane à traverser et de la différence entre les concentrations interne et externe. Elle s'exprime mathématiquement par la loi de Fick qui, dans le cas d'un processus unidirectionnel prend la forme:

$$\frac{dq}{dt} = k(C_i - C_e) \quad \text{avec} \begin{cases} C_i = \text{concentration interne} \\ C_e = \text{Conc. externe} \end{cases}$$

L'énergie utilisée est produite par l'agitation thermique du milieu. L'accumulation ne se fait pas contre un gradient de concentration .

II . Diffusion facilitée

Dans ce cas il est nécessaire qu'intervienne un intermédiaire:

le transporteur, qui s'associe à la substance transportée pour former une combinaison transitoire qui rend franchissable la barrière de diffusion. De ce fait l'expression de la vitesse du processus de transport est identique à celle de Michaelis-Menten représentative pour les réactions enzymatiques simples.

Comme pour la diffusion simple, il s'établit un équilibre entre les concentrations des compartiments interne et externe séparés par la membrane. En aucun cas il n'y a d'accumulation contre un gradient de concentration. En outre la diffusion facilitée ne fait pas intervenir d'énergie métabolique.

L'inhibition compétitive de ce type de transport par des analogues structuraux du substrat transporté permet de mettre en évidence l'analogie qui existe entre le comportement du transporteur et des enzymes. De plus, on remarque souvent que les vitesses de transport sont supérieures à celles que l'on pourrait attendre en regard de la taille des molécules et de la solubilité des substrats dans les lipides. Dans ce cas on note des Q_{10} toujours supérieurs à 2 et atteignant souvent 3 (25).

La manifestation du contre-transport (26) est encore une preuve de plus en faveur de l'existence d'un transporteur "symétrique" indépendant du métabolisme énergétique.

Les difficultés rencontrées au cours de l'isolement des transporteurs ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de certains groupements chimiques, c'est ainsi le cas des groupements sulfhydryles dans le transport du glucose au travers de la membrane érythrocytaire (27).

III . Transport actif

Ce type de transport, tout comme la diffusion facilitée, peut s'expliquer par l'intervention d'un transporteur mobile se com-

-binant au substrat. Ceci implique que le processus cinétique est du type Michaelis-Menten. En revanche, et contrairement à la diffusion facilitée, il requiert la production d'énergie métabolique; de ce fait il est sensible aux inhibiteurs habituels des réactions enzymatiques et du métabolisme, principalement aux inhibiteurs de la phosphorylation oxydative.

L'accumulation du substrat se fait contre un gradient de concentration .

L'équilibre qui s'établit ainsi est un équilibre dynamique, c'est à dire qu'il y a égalité entre les vitesses d'entrée et de sortie du substrat (KEPES (28)).

Il est donc souvent difficile de faire la distinction entre la diffusion facilitée et le transport actif, surtout si le substrat est métabolisable. WIDDAS (29) a même avancé l'hypothèse que le transport actif est un phénomène de diffusion facilitée suivi d'une utilisation ou d'une accumulation qui dépend . de l'énergie fournie par le métabolisme.

Ces différents processus interviennent aussi bien dans le transport des substances organiques (sucres, acides aminés, ...) qu'inorganiques (anions, cations).

Seuls les transports de quelques anions ont été étudiés. Ainsi MITCHELL (30) a trouvé que le transport des phosphates inorganiques s'apparente à une diffusion facilitée. D'autre part PARDEE et coll. ont mis en évidence une perméase responsable du transport des sulfates chez Salmonella typhimurium (31-32-33). De même chez les champignons filamenteux BARFIELD et coll. (16) estiment que le transport des sulfates dépend directement d'une perméase.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au transport des cations.

On a pu mettre en évidence un transport actif du potassium et du sodium chez *E.coli* ; KEPES et COHEN (34) ont, en effet, observé des concentrations internes en potassium environ mille fois supérieures à celles du milieu extérieur, quand celles-ci sont faibles.

De même LOWE (35) a proposé un mécanisme liant le transport actif du sodium et du potassium à l'hydrolyse de l'ATP dans les cellules animales.

L'étude de l'exsorption de K^+ dans des disques frais de pomme de terre (36) a permis de conclure à l'existence de trois compartiments cellulaires (l'espace libre, le cytoplasme et la vacuole) dont le comportement est différent vis à vis du potassium.

Cependant tous ces phénomènes ne sont pas simples, c'est ainsi que GOLDMAN et coll. (37) ont montré que l'exposition d'*E.coli* à des milieux exempts de potassium stimule la synthèse d'une protéine dont la fonction est de contrôler la vitesse du transport actif du potassium.

Les cations monovalents, et en particulier K^+ et Na^+ interviennent aussi lors du transport des sucres et des acides aminés. Ainsi CRANE et coll. (38) ont montré l'influence positive de Na^+ sur la constante de Michaelis du transport intestinal des sucres alors que K^+ , Li^+ et NH_4^+ ont un rôle inhibiteur. De même CHRISTENSEN et coll. (39-40) ont mis en évidence un véritable co-transport des ions Na^+ et des acides aminés, la présence des uns favorisant nettement le transport des autres.

Cas des cations bivalents

D'après ROTHSTEIN (41-42) la pénétration des cations bivalents dans les cellules de Levure est liée à leur fixation sur des groupements électronégatifs situés à l'extérieur de la membrane. Deux sortes de

sites de fixation ont été identifiés, les groupements phosphoryles et les groupements carboxyles.

SILVER (43) et SILVER et coll. (44) ont mis en évidence deux systèmes de transport actif différents pour le magnésium et pour le manganèse chez *E.coli*. Dans aucun des cas il n'a été fait mention de phénomènes de compétition entre ces ions et K^+ ou Ca^{2+} . BATTACHARYYA (45) et WEBB (46) ont même réussi à mettre en évidence un transport actif du manganèse dans les membranes isolées d'*E.coli*.

JENNINGS et coll. (47) ont montré une participation probable des ions phosphates dans la structuration d'un transporteur pour les ions Mg^{2+} et Mn^{2+} vers l'intérieur des cellules de levures. Le système de transport des cations est induit par les ions phosphates, ce qui suggère qu'un phénomène de phosphorylation intervient dans ce processus. Cette hypothèse semble confirmée par l'inhibition du transport du magnésium par une faible concentration en ions arsénates (48).

D'autre part la vitesse optimale de pénétration des ions Mg^{2+} dépend du contenu relatif de la cellule en K^+ et en phosphates. Une cellule riche en K^+ et pauvre en phosphates ne peut pas absorber beaucoup de magnésium, par contre une cellule riche en phosphates et pauvre en K^+ absorbe une grande quantité de Mg^{2+} .

VASINGTON et MURPHY (49) ont montré que K^+ et Mg^{2+} peuvent se fixer et s'accumuler dans les mitochondries de rein de rat par des processus dépendant directement de la respiration et de la phosphorylation ce qui semble confirmer les résultats précédents. Ces auteurs ont également démontré que des quantités non négligeables de Ca^{2+} peuvent se fixer sur ces mitochondries au cours d'un processus nécessitant de l'ATP, des ions Mg^{2+} et un phosphate inorganique. Les découpleurs du transport des électrons et de la phosphorylation oxydative: antimycine A, 2-4 di-

-nitrophénol et azoture de sodium, inhibent ce transport.

Cependant la présence d'ions phosphates ne semble pas fondamentale dans tous les cas, ainsi WALLING et ROTHMAN (50) ont montré que le calcium est transporté activement dans l'intestin de rat, même en l'absence d'ions phosphates. Cependant dans ce dernier cas la présence d'ions Cl^- , HCO_3^- ou SO_4^{2-} en petite quantité est nécessaire.

Dans le cas de la Levure, FUHRMANN et ROTHSTEIN (51) ont montré que Ni^{2+} , Co^{2+} et Zn^{2+} utilisent le même transporteur que Mg^{2+} . Ces mêmes auteurs ont ainsi établi un classement des ions par affinité décroissante pour le transporteur:



La vitesse de transport est augmentée en présence de glucose. Cette vitesse est multipliée par un coefficient compris entre 5 et 20 quand les cellules sont prétraitées simultanément avec phosphate et glucose ce qui laisse entrevoir l'intervention des processus de la respiration et de la phosphorylation.

MAKINOSE (52) a mis en évidence l'importance du transfert du phosphoryle en γ de l'ATP sur la "protéine membranaire" des vésicules sarcoplasmiques durant le transport actif du calcium. Cette transphosphorylation ne se produit que quand Ca^{2+} et Mg^{2+} sont présents et quand il existe également des groupements -SH libres.

La nécessité de la formation de cette phosphoprotéine lors du transport du calcium coïncide en particulier avec une activité intense des ATPphosphohydrolases ou ATPases.

Il est probable que ces enzymes, localisées dans les membranes, jouent dans tous les cas de transport d'ions, mono ou bivalents, un rôle fondamental ou du moins très important BOWLER et DUNCAN (14-15), SKOU (53-54), DIETZE et HEPP (55).

Cependant il ne faut pas oublier que les cations de métaux lourds comme le fer, l'or, le cuivre, sous forme ionique, donnent très facilement naissance à des chélates. Ainsi le cuivre sous forme Cu^{2+} donne des complexes avec les acides organiques, les acides aminés (en particulier avec les résidus lysine, histidine et cystéine (56)) et aussi avec les protéines: albumine et céruléoplasmine du sérum sanguin (57-58).

HARRIS et SASS KORTSAK (59) ont ainsi montré que l'addition d'acides aminés à des concentrations telles qu'on les rencontre dans le sérum sanguin, facilite l'entrée du cuivre dans les tranches de foie de rat in vitro. Cette action, abolie en anaérobiose, n'est pas affectée par la présence de 2-4 dinitrophénol (inhibiteur du processus respiratoire par découplage de la phosphorylation oxydative). Si le type de transport et son mécanisme exact n'ont pas été établis les expériences réalisées permettent d'affirmer que ce n'est pas une simple diffusion.

On rencontre d'ailleurs un problème semblable quand on étudie la perméation de l'or (60) et du fer (61) pour lequel HELBOCK et SALTMAN ont montré que la structure chimique des chélates affecte directement la vitesse de transport à travers la membrane ainsi que la distribution tissulaire. Ces auteurs concluent même à l'importance fondamentale des mécanismes de chélation dans le transport des métaux. Cette affirmation est d'ailleurs confirmée par différents auteurs (62-63).

Nous mentionnerons ici le rôle de "passeur de membrane" qui a été attribué à certains complexes polypeptides cycliques -- cations comme la valinomycine, la nigéricine, ... (64).

Ces antibiotiques sont en effet capables de complexer les ions Na^+ et K^+ pour leur permettre de traverser la membrane mitochondriale au cours du processus respiratoire ce que les cations seuls ne peuvent pas faire.

Dans le cas plus précis du cuivre, NEUMANN et SILVERBERG (65) avaient cru pouvoir conclure à un transport actif de cet élément dans les tissus de mammifères, cependant comme l'ont rappelé SASS KORTSAK et HARRIS (66) cette conclusion semble erronée ou tout du moins hâtive car il faudrait pouvoir déterminer la concentration en ions Cu^{2+} libres de chaque côté de la membrane ce qui n'a pu encore être fait.

Cependant en milieu minéral, le mycélium d'A.niger préalablement chargé en cuivre échange facilement une partie de cet élément avec le milieu extérieur, à la manière d'un échangeur d'ions. Toutefois une partie du cuivre préalablement fixé ne peut être échangée ce qui apporte un argument en faveur d'un processus de diffusion facilitée qui tend à confirmer les remarques de ROTHSTEIN dans le cas des levures (17-18).

BUT DE NOTRE TRAVAIL

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés, au cours de notre travail, à la biochimie du cuivre chez Aspergillus niger .

Ce problème revêt différents aspects parmi lesquels le transport présente un intérêt tout particulier. Rappelons, en effet, que le microorganisme étudié est capable de se développer en présence de teneurs relativement grandes en cuivre, contrairement à beaucoup d'autres organismes pour qui cet élément est toxique.

On pouvait à priori s'interroger sur la signification de cette faible toxicité que l'on peut apparemment expliquer soit par une fixation superficielle au niveau de la paroi, soit par une pénétration suivie de séquestration par certains constituants cellulaires.

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes préoccupés, tout d'abord, de savoir qu'elle était l'influence du cuivre sur la vitesse de croissance du microorganisme, ce qui nous a amené ensuite à considérer la cinétique du transport et à préciser l'influence du cuivre sur le métabolisme et en particulier sur l'activité respiratoire du mycélium.

Notre travail est distribué en trois parties que nous consacrons successivement :

- A l'étude de la croissance du microorganisme en présence de concentrations variables en cuivre.

- A l'établissement de la cinétique de fixation du cuivre par le mycélium ce qui nous a amenés à nous intéresser aussi à la contribution de certains acides aminés au transport du cuivre à travers la membrane.

- A l'étude des relations existant entre le transport du cuivre et

certaines activités métaboliques telles que :

- transport des sucres et biosynthèse des acides carboxyliques
- processus respiratoire au niveau du mycélium entier
- processus respiratoire au niveau des mitochondries isolées
- relation entre la fixation du cuivre par le mycélium et l'activité ATPasique membranaire.

Enfin dans la conclusion nous rassemblerons et discuterons l'ensemble des résultats obtenus.

M A T E R I E L e t M E T H O D E S

I - Le microorganisme

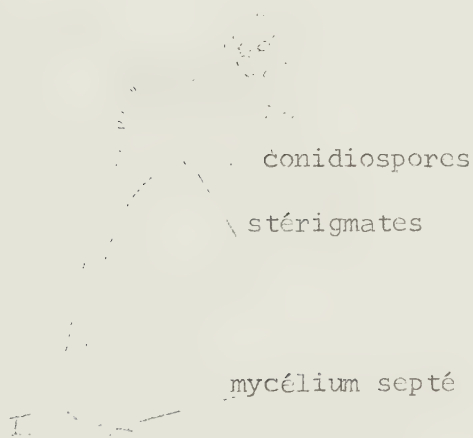
I - 1 - Classification

On dispose au laboratoire d'une souche d'Aspergillus niger Van Tieghem. Il s'agit d'un champignon supérieur du genre Aspergillus, classe des Ascomycètes, ordre des Plectascales.

A.niger forme des thalles d'aspect pulvérulent, et d'une couleur brun foncé, noire, due à la sporulation.

Le mycélium ramifié et septé donne naissance à de nombreux conidiophores. Ceux-ci sont formés d'une hyphe qui se renfle à son extrémité en une vésicule portant à sa surface, sur une ou

deux rangées de stérigmates, des conidiospores disposées en chaînes plus ou moins longues. Les corps fructifères sont des périthèces globuleux complètement clos qui contiennent des asques avec des ascospores. La couleur des conidiophores constitue un caracté-



-re distinctif pour les diverses espèces.

I - 2 - Propagation et conservation de la souche

Les spores sont obtenues après ensemencement au fil à boucle sur milieu glucosé et gélosé à 2%. A 27°C le développement du mycélium est rapide (24 à 36 heures), la sporulation est totale au bout de 3 jours. Les tubes sont alors fermés hermétiquement pour éviter la dessiccation et conservés au réfrigérateur à +4°C.

Lors de la conservation et de la propagation, pour éviter le plus possible les mutations spontanées et par là même, le risque de variation des propriétés étudiées, il est nécessaire de ne pas multiplier les repiquages de la souche. Il faut néanmoins veiller à ce que la souche ne "vieillisse" pas; à cette fin, nous repiquons la souche toutes les 5 à 6 semaines.

Malgré toutes ces précautions il est apparu au bout d'un certain temps de légères variations et en particulier une certaine difficulté à la sporulation, nous avons alors "régénéré" la souche sur pomme de terre. Cette méthode extrêmement simple nous a donné d'excellents résultats : dans un tube de Roux, contenant de l'eau distillée dans sa partie inférieure, on introduit un morceau de pomme de terre, après stérilisation le tube estensemencé à l'aide de la souche à régénérer. Les spores provenant de la croissance sont réensemencées dans les mêmes conditions au cours de trois opérations successives; ce traitement s'est avéré satisfaisant pour maintenir les caractéristiques physiologiques et biochimiques de la souche.

II - Milieu de culture

Connaissant l'influence de la concentration du milieu en glucose sur le transport de divers cations, il était intéressant à priori d'utiliser un milieu relativement pauvre en sucre.

Nous avons donc choisi le milieu de WATSON et SMITH (67) dont la composition est la suivante :

25 g de D(+) glucose	12 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3 g de NH_4NO_3	16 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2 g de KH_2PO_4	2 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$
	20 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

On complète à un litre avec de l'eau distillée, le pH est ajusté à 4,5 . Les fioles sont bouchées au coton cardé, puis stérilisées à la vapeur pendant 20 minutes à 115°C. Il est important de ne pas dépasser cette température afin d'éviter la caramélisation du glucose qui entraîne une modification notable du milieu.

III - Ensemencement et cultures

III - 1 - Ensemencement

Les spores dont on dispose sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile à laquelle on ajoute du cholate de sodium (environ 50 mg pour 100 ml d'eau). L'addition du cholate de sodium entraîne une diminution de la tension superficielle de l'eau et permet ainsi une bonne homogénéisation de la suspension de spores.

On enseme avec une suspension contenant environ $3,6 \times 10^6$ spores par ml (détermination à l'hématimètre de THOMA), à raison de 1ml de suspension pour 50 ml de milieu de culture.

III - 2 - Cultures

Les cultures sont réalisées, en chambre thermostatée à 28°C, dans des erlenmeyers de 100 ml, sur un agitateur à plateau horizontal animé d'un mouvement rotatif (250 tours-minute).

L'aération du milieu étant un facteur limitatif de la croissance, il est indispensable de ne remplir qu'en partie les erlenmeyers dans lesquels on introduit 50 ml de milieu.

Le mycélium obtenu est blanchâtre, de structure granulaire sphérique tout à fait caractéristique.

Pour obtenir du mycélium en quantité plus importante, on a aussi développé des cultures dans un fermenteur de 5 litres (New Brunswick Scientific and Co - New Jersey -U.S.A.). Le milieu est aéré par agitation et insuflation d'air. La vitesse d'agita-

tion est de 250 tours par minute. Le débit de l'air injecté à la partie inférieure du fermenteur est de 1,8 l par minute. Ce débit est amplement suffisant pour maintenir à tout moment la saturation du milieu en oxygène dissous.

Après 70 heures de croissance, le mycélium est recueilli sur une gaze propre et humidifiée. Dans ces conditions il présente le même aspect que le mycélium provenant d'une culture en erlenmeyer. Le rendement de croissance est de l'ordre de 1 g de mycélium sec pour 3 g de glucose consommé.

IV - Dosage du glucose

Nous avons utilisé deux méthodes de dosage :

-- méthode "phénol-sulfurique"

-- méthode enzymatique

La première nous a servi au dosage du glucose résiduel dans le milieu de culture lors des études de croissance. La seconde, très spécifique, a été réservée aux dosages les plus précis.

IV - 1 - Méthode "phénol-sulfurique"

--Mode opératoire

Un millilitre de solution aqueuse contenant de 10 à 70 μ g de sucre est introduit dans un tube à essais de 25 ml. On y ajoute 1 ml d'une solution de phénol à 5% dans l'eau (p/v) et on mélange. Les blancs sont préparés en remplaçant la solution sucrée par de l'eau. On ajoute à chaque tube, avec précaution et en agitant, 5 ml d'acide sulfurique à 96%. Après 10 mn de repos, les tubes sont à nouveau agités et placés dans un bain marie à 25-30°C pendant 20 mn. Une coloration jaune-orangée apparaît, elle est stable durant plusieurs heures.

-- Lecture et résultats.

On mesure l'absorption à 485 nm contre un blanc. Le dosage est effectué par comparaison avec une courbe étalon préétablie à l'aide de solutions contenant de 10 à 70 mg de glucose par litre (Fig. 1).

La coloration jaune-orangée étant stable, les dosages sont facilement reproductibles et la précision de la méthode est de l'ordre de 3% . Elle présente cependant l'inconvénient d'être très peu spécifique vis à vis du glucose; elle permet de doser en fait de nombreux sucres : oligosides, polyholosides ainsi qu'un certain nombre de leurs dérivés.

Malgré son absence de spécificité, nous avons retenu cette méthode pour la plupart des dosages de glucose contenu dans des milieux simples, notamment pour les dosages du glucose résiduel au cours de la croissance du microorganisme.

IV - 2 -- Méthode enzymatique.
.....

Cette méthode spécifique du glucose, permet de doser des quantités très faibles de ce sucre.

Le principe en est le suivant :

Le glucose est transformé en glucose-6-phosphate à l'aide d'ATP et d'hexokinase, puis le glucose-6-phosphate est deshydrogéné en gluconolactone-6-phosphate par la glucose-6 phosphate deshydrogénase en présence de NADP^{+} . La mesure consiste à doser au spectrophotomètre (335nm) la formation correspondante de $\text{NADPH}, \text{H}^{+}$.

-- Réactifs :

Solution 1 { - tampon triéthanolamine 0,3 M - pH 7,5
 { .. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004 M

Solution 2 - NADP^{+} 0,012 M

Solution 3 - ATP 0,016 M

Solution 4 { - hexokinase 1 mg/ml
 { - glucose-6-phosphate deshydrogénase 2 mg/ml

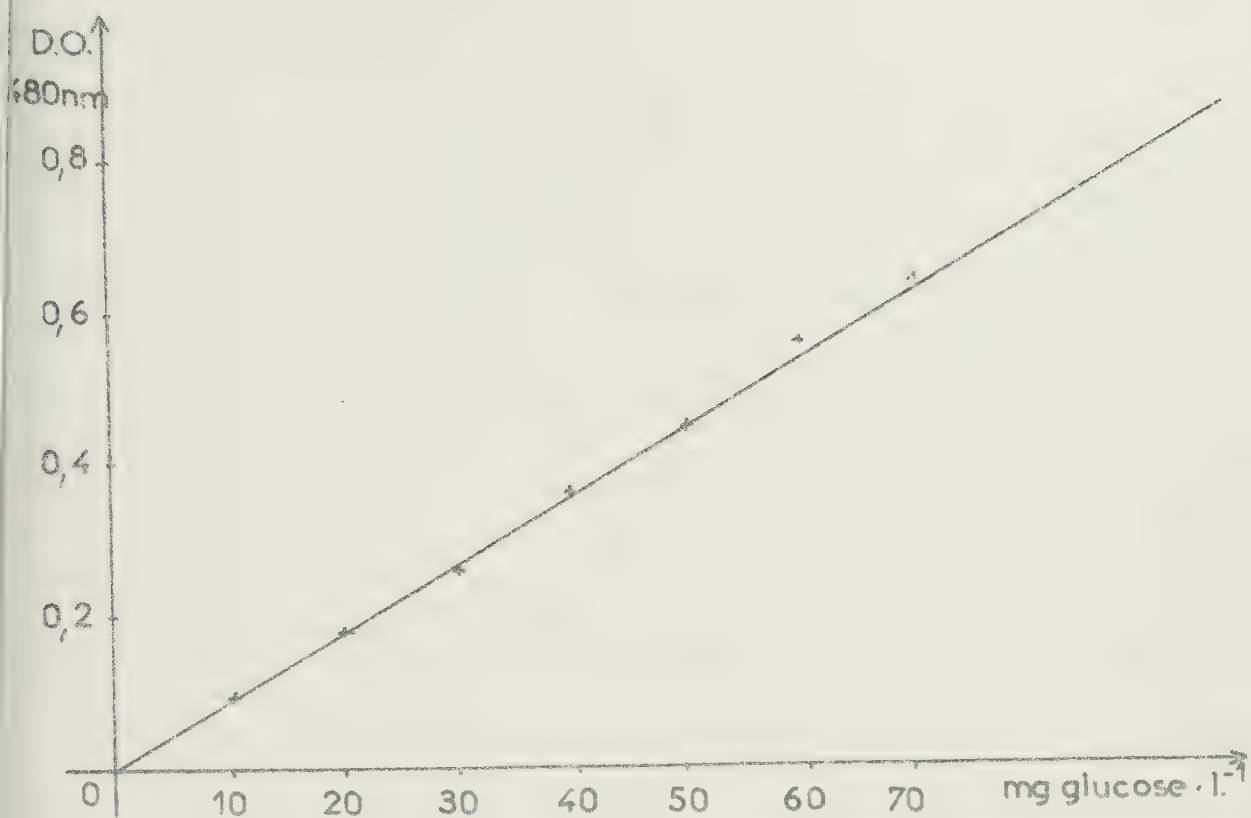


Fig. 1 : Dosage du glucose par la méthode phénol-sulfurique

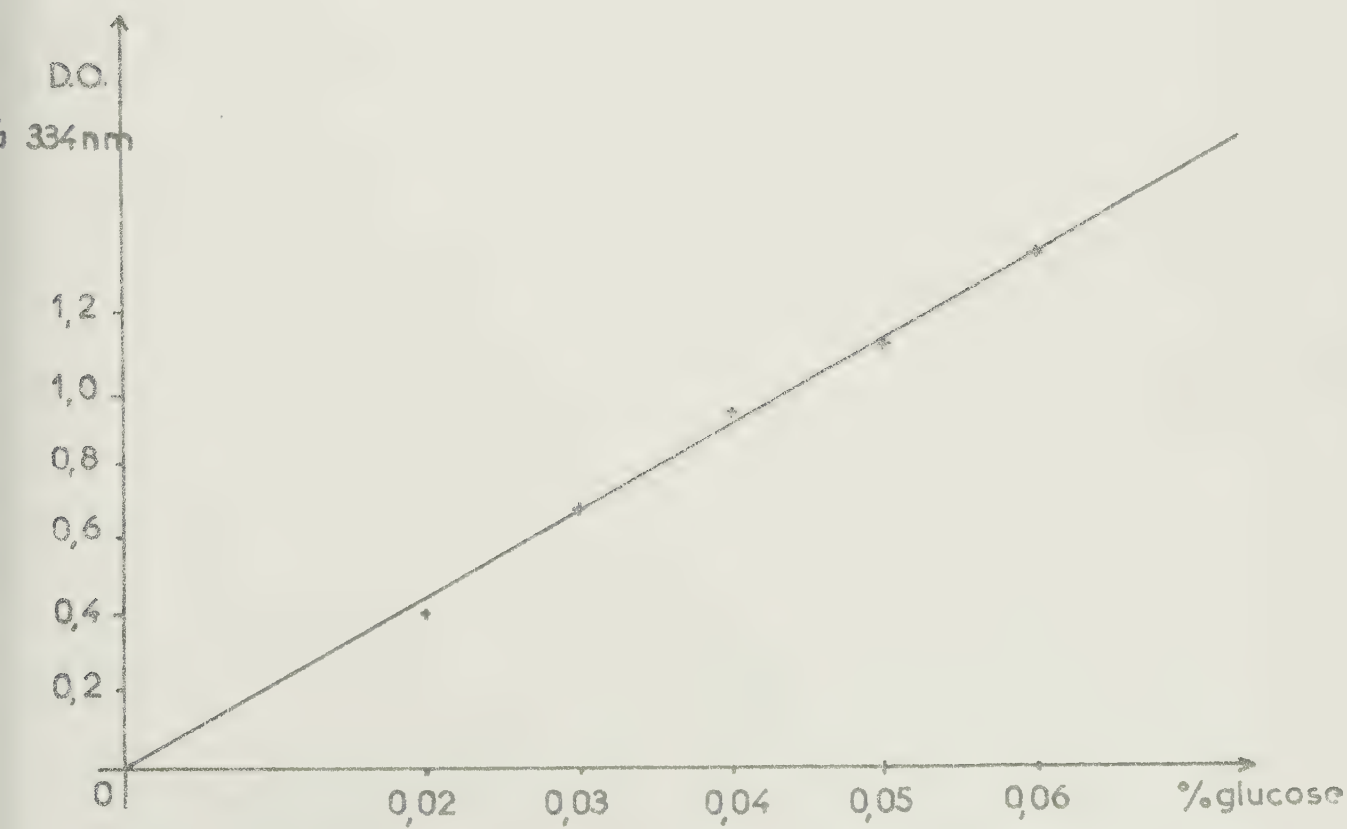


Fig. 2 : Dosage du glucose par la méthode enzymatique

Mode opératoire :

La solution à doser doit contenir environ 0,05% de glucose. A 2,60 ml de la solution 1, on ajoute 0,20 ml de la solution à doser, puis 0,10ml de la solution 2 et 0,10 ml de la solution 3 ; après avoir mélangé, on mesure l'extinction E_1 . On ajoute ensuite 0,02 ml de la suspension 4 . On attend la fin de la réaction (environ 10 minutes) et on obtient une nouvelle valeur E_2 de l'extinction. La différence $E_2 - E_1$ correspond à la quantité de glucose présent dans la solution à doser. Cette valeur est aisément déterminée par comparaison avec une courbe d'étalonnage préétablie. (Fig. 2).

Remarque : La déprotéinisation des échantillons est obtenue, si nécessaire, par traitement à l'acide trichloroacétique 0,33 N ou à l'acide perchlorique 0,33 N .

V - Etude de la croissance d'Aspergillus niger

Cette étude a été effectuée avec le milieu de WATSON et SMITH (67) dont la composition a été donnée plus haut.

Pour cette étude préliminaire le taux de cuivre a été fixé à sa valeur normale, c'est à dire 2 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ par litre de milieu soit approximativement 0,5 mg de cuivre ionique par litre.

Les courbes de croissance ont été établies en fonction du temps, soit à partir des poids secs de mycélium recueilli dans 50 ml de milieu, soit par dosage du glucose résiduel contenu dans le milieu de culture au moment de la récolte.

On enseme, pour une même culture, un nombre suffisant d'ermenmeyers de 100 ml contenant chacun 50 ml de milieu de culture à l'aide d'1 ml d'une même suspension de spores. Grâce à ces précautions et malgré la difficulté de préparer 2 suspensions présentant le même nombre de spores par millilitre et dans le même état physio-

-logique, la méthode employée nous a donné des résultats reproduc-
-tibles.

Pour chaque mesure, on filtre le contenu d'un erlenmeyer sur
membrane Millipore (25 ea, RA 1,2 μ -47 mm de diamètre). Puis le
mycélium est porté à l'étuve à 65°C pendant 12 heures. Il est impor-
-tant de signaler que le séchage à des températures plus élevées
conduit à de mauvais résultats.

Dans ces conditions la courbe des poids secs (Fig. 3) présente
toutes les caractéristiques d'une courbe de croissance normale(68-69).

Le tracé de cette courbe en coordonnées semi-logarithmiques
permet d'y reconnaître 5 phases caractéristiques:

- de 0 à 30 heures : phase d'accélération
- de 30 à 70 heures : phase exponentielle
- de 70 à 80 heures : phase de ralentissement
- de 80 à 92 heures : phase stationnaire
- au dessus de 92 heures : phase de déclin (lyse du
mycélium)

Sur le filtrat recueilli au cours de la récolte du mycélium, on
détermine la concentration résiduelle en glucose par la méthode
"phénol-sulfurique". La courbe obtenue dans ces conditions (Fig.4)
est en tout point comparable à la courbe des poids secs.

L'épaule caractéristique qui apparaît au delà de la phase
stationnaire et qui coïncide avec le début de la lyse du mycelium
est à imputer à la formation de sucres ou de dérivés de sucres
différents du glucose.

VI - Etude respirométrique

VI - 1 Mesure de la consommation en oxygène et du rejet de CO₂

Nous avons utilisé indifféremment deux appareils : le respiro-
-mètre de WARBURG et le respiromètre "GILSON".

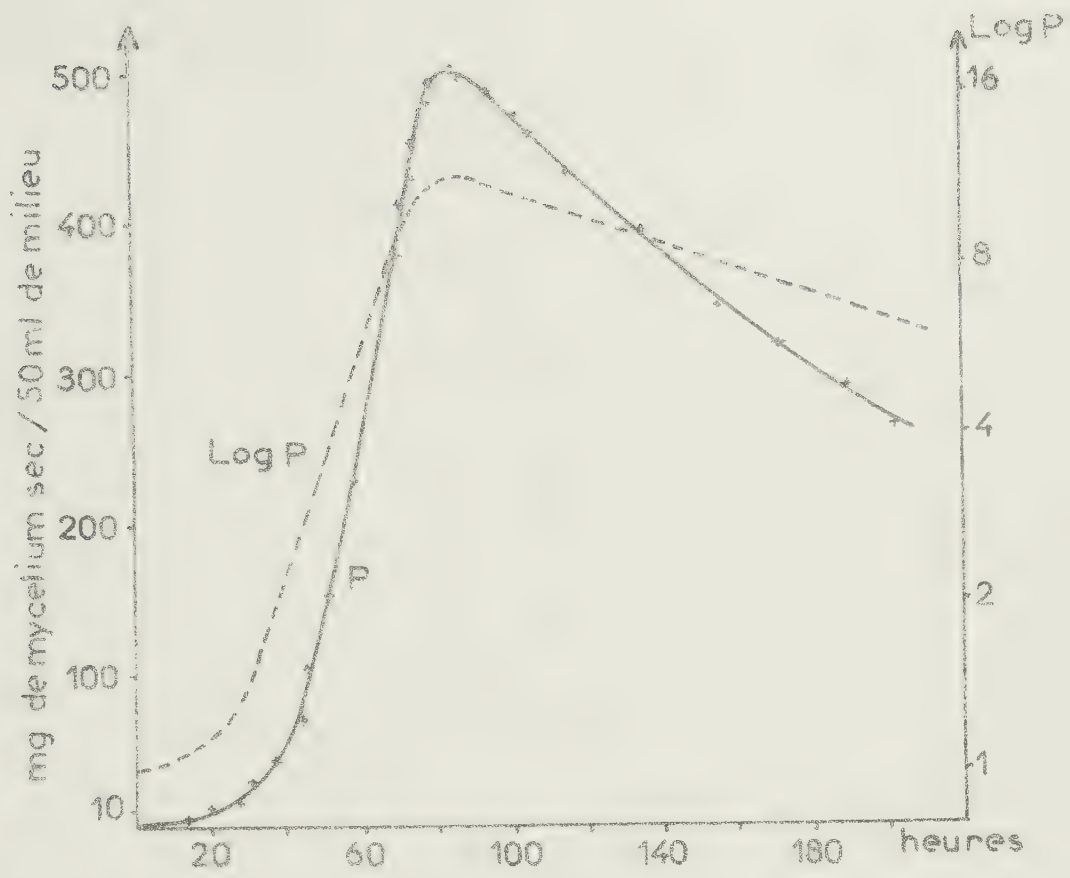


Fig. 3 . Courbe de croissance d'A.niger (poids secs)
(milieu normal : $0,5 \text{ mg Cu}^{++} \cdot \text{l}^{-1}$)

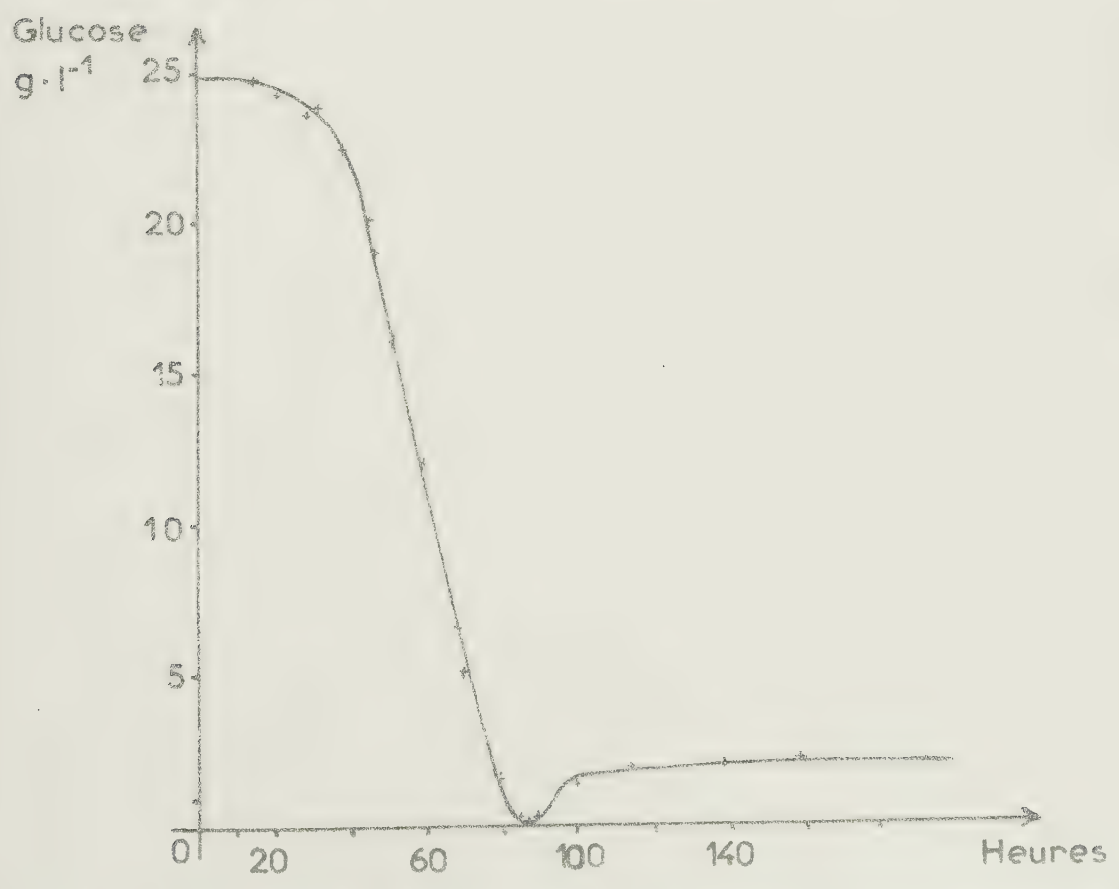


Fig. 4 . Courbe de croissance d'A.niger (glucose résiduel)
milieu normal : $0,5 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{l}^{-1}$

Dans le cas du mycélium intact on introduit dans des fioles de WARBURG de 50 ml :

- 10 ml de milieu de culture
- mycélium en phase de croissance exponentielle : 15 à 20 mg (exprimés en poids sec).
- 0,5 ml d'une solution de sulfate de cuivre à des concentrations variables.

On maintient la température du bain-marie soit à $27^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ soit à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Dans ces conditions la durée de l'expérience n'excède pas trois heures. Tous les résultats sont exprimés en μl d'oxygène par mg de mycélium sec, dans les conditions normales de température et de pression.

Afin d'estimer l'influence du glucose sur la respiration nous avons utilisé également un autre milieu décrit par OHNISHI et coll. (70) comme facilitant la respiration des mitochondries. Sa composition est la suivante :

- Acide α -cétoglutarique	6 mM
- Mannitol	0,5 M
- Tampon phosphate pH 6,5	10 mM
- Tampon Tris-maléate pH 6,5	20 mM
- KCl	10 mM
- EDTA	0,1 mM
- ADP	315 μM
- Eau distillée	qsp 1 litre.

De même, nous avons utilisé un milieu plus complet que le précédent qui a été décrit par WATSON et SMITH (67). En remplacement du mannitol ce milieu contient du saccharose qui permet notamment le dosage des phosphates par la méthode de LOWRY et LOPEZ (71).

Le compartiment central de chaque fiole de WARBURG contient dans ces conditions:

- Saccharose 166 mM
- KCl 4,2 mM
- KH_2PO_4 8,3 mM
- EDTA 0,4 mM
- Sérum albumine bovine 5 mg
- Suspension de mitochondries 0,5 ml (soit environ 4 à 7 mg de protéines).

Dans l'appendice on ajoute :

- | | | | |
|-------------|---------|------------|------------------------------------|
| - ADP | 2,1 mM | Substrat : | { 8,3 mM Succinate |
| - Glucose | 20,8 mM | | { 8,3 mM α -cétoglutarate |
| -Hexokinase | 2,5 mg | | { 2,1 mM NADH, H^+ |

Pour absorber le CO_2 libéré, on introduit 0,1 ml de KOH à 40% dans le récipient central de la fiole.

Les fioles sont ensuite équilibrées à 30°C pendant 8 minutes puis le contenu de l'appendice est basculé dans le récipient annulaire. On suit alors l'absorption de l'oxygène pendant 20 à 25 minutes.

Dans ces conditions le volume du milieu réactionnel atteint 2,4 ml tandis que le pH se stabilise à 6,5.

La réaction est arrêtée par addition d'un volume équivalent d'acide trichloracétique à 10%, pour permettre le dosage des orthophosphates libérés.

VI - 2 - Mesure polarographique de la concentration en oxygène dissous

Cette méthode plus précise a été utilisée pour confirmer les mesures réalisées au respiromètre.

VI - 2 - 1 Principe

Lorsqu'on crée une tension de polarisation entre les deux

électrodes (cathode de platine, anode de référence plongeant dans une solution de KCl), séparées du milieu d'incubation par une fine membrane de polyéthylène, l'oxygène subit une réduction électrolytique à la surface de la cathode. L'intensité du courant d'électrolyse ainsi produit est proportionnelle à la concentration de l'oxygène dissous dans la solution.

VI - 2 - 2 Matériel

- . Oxygraphe "GILSON" modèle KM avec micro-électrode de CLARK
- . Cellule, thermostatée à 25°C, de 1,6 ml
- . Vitesse de déroulement du papier : 12 mm/minute.

VI - 2 - 3 Méthode

Dans tous nos essais, nous avons introduit 1,24 ml de milieu de culture (milieu de WATSON normal) dans la cellule, où il est agité pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique pour le saturer en oxygène.

On ajoute ensuite 0,4 ml de la suspension de mycélium préalablement remis en suspension dans le même milieu. L'apport en mycélium est alors de 5 mg (poids sec).

La cellule est fermée à l'aide d'un bouchon traversé par un conduit capillaire de manière à isoler le milieu de réaction de l'atmosphère. Les différentes injections dans la cellule se font à l'aide de microseringues par ce conduit capillaire.

VII - Extraction et identification des acides carboxyliques excrétés dans le milieu de culture.

VII - 1 - Extraction

Il s'agit tout d'abord d'extraire les acides carboxyliques du milieu de culture en fin de phase exponentielle.

Après récolte du mycélium, le milieu est amené à pH 1,0 à l'aide d'acide sulfurique concentré, puis on effectue une extraction à l'éther éthylique fraîchement distillé sur sulfate ferreux. La phase aqueuse résiduelle est éliminée, tandis que la solution éthérée surnageante qui contient les acides carboxyliques, est évaporée sous vide. Le résidu est repris par une solution de NaHCO_3 à 5%, et extrait à l'éther à pH 7,5 -- 8 ; ainsi les substances solubles autres que les acides carboxyliques sont éliminées dans cet extrait éthéré. On ramène ensuite la phase aqueuse résiduelle à pH 1,0 à l'aide d'acide sulfurique concentré et on la soumet à une nouvelle extraction à l'éther éthylique. La phase éthérée, contenant les acides carboxyliques est finalement évaporée sous vide. Le résidu obtenu contient encore trop de sels minéraux pour être chromatographié sur couche mince de cellulose. Il est alors nécessaire de déminéraliser la solution précédente par passage sur une colonne garnie de résine cationique (Duolite C 20 sous forme H^+); après ce traitement, la solution aqueuse recueillie ne contient plus que des acides que l'on extrait par traitement à l'éther. Cette phase éthérée est ensuite évaporée sous vide permettant ainsi d'isoler des produits bien cristallisés.

VII -- 2 -- Identification.

.....

VII -- 2 -- 1 Chromatographie sur papier (Fig. 5--a)

Nous avons employé la chromatographie monodimensionnelle sur papier Whatman n°1 avec le solvant suivant:

Ethanol- NH_4OH concentrée-Eau (160 / 10 / 30) v/v (72)

Le temps de migration est de 24 heures.

On révèle au Vert de bromocrésol : après dissolution de 0,04 g de Vert de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol à 96%, on ajoute de la soude 0,1 N en quantité juste suffisante pour obtenir le

virage du vert au bleu.

Tableau n°1 : Séparation des acides carboxyliques sur papier Whatman n°1

Acides	R _f	Acides	R _f
Cis-aconitique	0,24	Succinique	0,44
Trans-aconitique	0,26	Fumarique	0,45
Citrique	0,16	Oxalique	0,00
Isocitrique	0,38	Glutarique	0,48
Itaconique	0,44	Chlorhydrique	0,62

VII - 2 - 2 Chromatographie sur couche mince de cellulose (73)

Les acides du cycle de l'acide citrique et quelques acides aminés sont séparés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (250 μ) de cellulose.

Solvant n°1 :

Ether éthylique-Acide formique-Eau (7/2/1) v/v

Solvant n°2 :

Phénol-Eau-Acide formique (75/25/1) p/v/v

Pour assurer une bonne identification de l'acide fumarique , il est nécessaire de procéder à un "prélavage" des couches minces à l'aide d'un mélange de même composition que le solvant n°1.

Après séchage des plaques on dépose les échantillons et on procède à la chromatographie.

Les acides sont révélés au Vert de bromocrésol.

Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 5-b et le tableau n°2

Chromatographie des Acides Carboxyliques



Fig. 5a. Chromatographie ascendante sur papier Whatman n°1

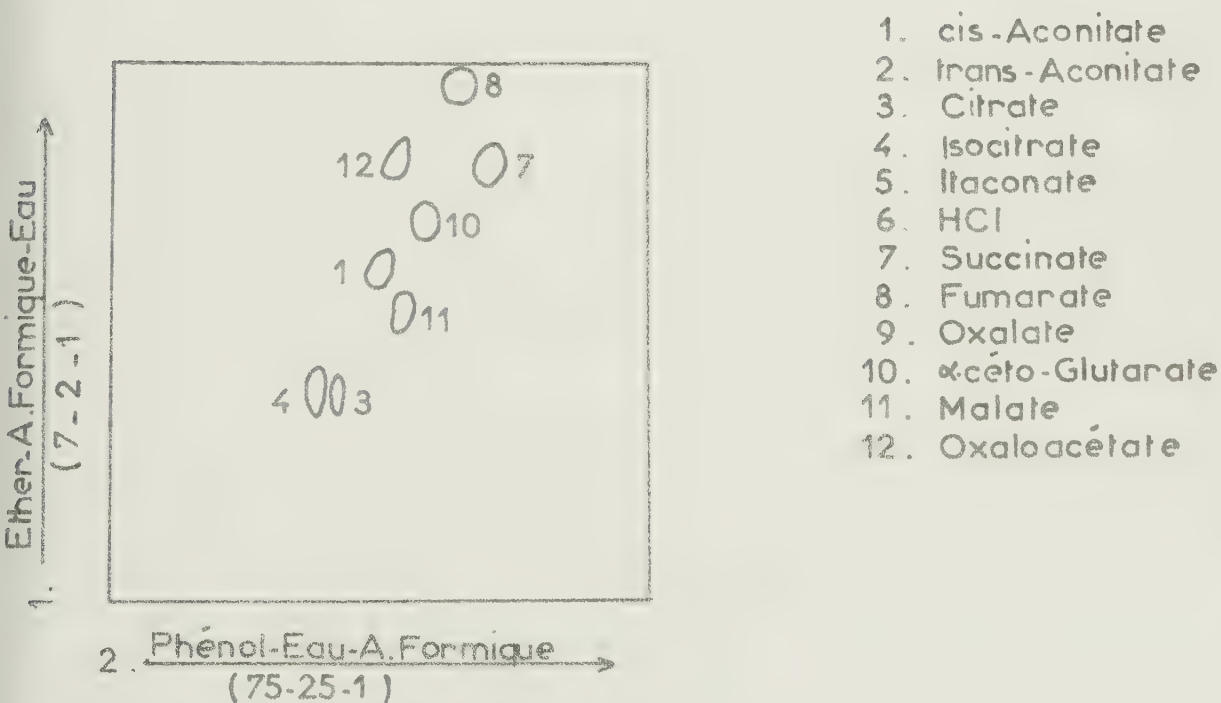


Fig. 5b. Chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de cellulose.

Tableau n°2 : Séparation des acides carboxyliques sur
couche mince de cellulose.

Acides	R _f (1 ^{ère} dimension)	R _f (2 ^{ème} dimension)
α-céto-glutarique	0,70	0,59
Succinique	0,81	0,71
Fumarique	0,96	0,66
Malique	0,54	0,54
Oxaloacétique	0,82	0,54
Citrique	0,38	0,42
Isocitrique	0,38	0,39
Cis-aconitique	0,62	0,51

VIII - Extraction des mitochondries d'*Aspergillus niger*

La méthode que nous avons utilisée, a été étudiée par WATSON et SMITH (67) qui l'ont récemment améliorée (74).

Toute la manipulation se déroule entre 0 et 4°C.

Le mycélium, une fois essoré (environ 10 à 15 g exprimés en poids humide), est lavé à l'eau glacée puis à l'eau distillée, avant d'être homogénéisé dans 20 ml du milieu d'extraction suivant :

0,5 M Mannitol	}	pH 7,0
2 mM EDTA		

Cette dernière opération est effectuée à l'aide d'un broyeur cellulaire MSK Braun dans un récipient en verre durant 2 périodes de 30 secondes.

L'homogénat est filtré au travers d'une mousseline humide, puis centrifugé à 800 g pendant 7 minutes. Le surnageant est décanté puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes.

La fraction mitochondriale est ensuite remise en suspension avec précaution dans le mélange :

0,5 M Mannitol	}	pH 6,5
0,2 mM EDTA		

On répète deux fois le traitement précédent en prenant soin, dans la deuxième étape, de refaire la deuxième centrifugation à basse vitesse (800 g) pour obtenir des mitochondries "propres".

Les mitochondries sont finalement remises en suspension dans un volume minimum du tampon suivant.

0,5 M Mannitol	}	pH 6,5
2 mM EDTA		

Remarque : Dans le cas où il est nécessaire de doser les phosphates on remplacera le mannitol par du saccharose aux mêmes concentrations car le mannitol interdit leur dosage par la méthode de LOWRY et LOPEZ.

IX - Extraction et mesure de l'activité des ATPases membranaires d'A.niger

IX - 1 Extraction des ATPases membranaires d'A.niger.

Pour extraire ces enzymes, nous nous sommes inspirés de la méthode de DETTMER et coll. (75) que nous avons adaptée au micro-organisme étudié.

Après lavage avec une solution aqueuse glacée contenant 5 mM de tampon Tris-EDTA, le mycélium est homogénéisé au broyeur cellulaire MSK dans 9 volumes de saccharose 0,25 M tamponné dans du tampon Tris-HCl 30 mM (pH 7,4).

L'homogénat est centrifugé à 100 000 g pendant 30 minutes pour rassembler dans le culot les particules subcellulaires ayant une activité ATPasique. Le surnageant est éliminé. Le culot, remis en suspension dans le même tampon saccharose est centrifugé à 100 000 g. Cette opération est effectuée 2 fois.

Le nouveau culot est repris dans le tampon Tris-saccharose dans lequel on a introduit 0,15% de déoxycholate de sodium. Ce traitement a pour but de dépelotonner les protéines globulaires. Après un repos de 60 minutes à +3°C, la suspension est soumise à

une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes. Le culot est éliminé, le surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 30 minutes. Après avoir renouvelé cette centrifugation le sédiment obtenu est remis en suspension dans le volume minimum de tampon Tris-saccharose et congelé à -20°C .

Remarque : Dans le cas de l'utilisation de cet extrait en présence de cuivre, il est absolument nécessaire de proscrire l'utilisation de tampon Tris ce dernier formant des complexes stables avec cet élément. Dans ces conditions nous avons préféré utiliser le tampon Imidazole-HCl 1mM pH 7,4 .

IX - 2 - Mesure de l'activité ATPasique

Nous avons utilisé ici une variante des méthodes préconisées par DETTMER (75) et ATKINSON (76).

Dans des tubes de 10 ml, on introduit 2 ml de milieu contenant en concentration finale :

- Tampon Imidazole-HCl 1 mM pH 7,4
- .. 3 mM MgCl_2
- 3 mM ATP sel de sodium
- .. 94 mM NaCl
- 30 mM KCl

auxquels on ajoute 0,5 ml d'une solution aqueuse contenant des concentrations variables de cuivre et 0,5 ml de la solution enzymatique précédente.

Après 15 minutes, on interrompt la réaction par addition de 1,5 ml d'acide perchlorique 0,3N refroidi. On amène ensuite les extraits à pH 4,2 par addition de 4 volumes d'acétate de sodium 0,1 M .

Le dosage des orthophosphates libérés au cours de la réaction est effectué suivant la méthode de LOWRY et LOPEZ (71).

Les différents échantillons provenant de l'attaque enzymatique sont dilués avec du tampon acétate pH 4,2 (acide acétique 0,1 N - acétate de sodium 0,025 N) jusqu'à ce que la teneur en orthophosphates soit comprise entre 0,015 et 0,1 mM (0,05 et 0,3 mg % de Pi).

A chaque volume d'extrait, on ajoute 0,1 volume d'acide ascorbique à 1% et 0,1 volume de molybdate d'ammonium à 1% dans l'acide sulfurique 0,05 N.

Les lectures sont effectuées, après 10 minutes de réaction, au spectrophotomètre à 670 nm.

X -- Dosage du cuivre

X -- 1 -- Méthode de dosage

.....

Il existe de nombreuses méthodes de dosage de cet élément, cependant pour des raisons de rapidité mais aussi de précision nous avons écarté les méthodes colorimétriques pour utiliser la spectrophotométrie d'absorption atomique.

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Techtron AA 4 .

Dans le cas du cuivre la spectrophotométrie d'absorption atomique permet un dosage très précis, la réponse de la lampe étant absolument linéaire pour le domaine étudié. Rappelons que la limite de détection du cuivre dans une solution aqueuse est de l'ordre de 0,04 mg/l.

X -- 2 -- Mise en solution du cuivre

.....

Le dosage du cuivre dans le milieu de culture ne pose pas de problème particulier, cependant la détermination de la quantité de cet élément, absorbée par le mycélium, nécessite une minéralisation préalable.

On introduit environ 70 à 80 mg de mycélium sec dans un matras

de 25 ml, on ajoute 0,5 ml d'acide sulfurique concentré et 0,5 ml d'eau oxygénée à 110 volumes puis on chauffe avec précaution. Quand la solution brunit, on ajoute à nouveau 0,5 ml d'eau oxygénée et on poursuit la minéralisation jusqu'à décoloration totale de la solution. Après refroidissement, le contenu du matras est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

Cette solution est directement introduite au niveau du brûleur du spectrophotomètre d'absorption atomique.

XI -- Préparation des complexes Thréonine-Cuivre

XI -- 1 -- Complexe Thréonine-Cuivre non actif (77)

Un gel d'hydroxyde de cuivre, fraîchement préparé par addition d'une solution de soude concentrée (40% p/v) à une solution d'acétate de cuivre 2 M, est dialysé, dans un boyau de cellulose régénérée, contre de l'eau distillée pendant une heure trente à deux heures afin d'éliminer les dernières traces d'acétate de sodium.

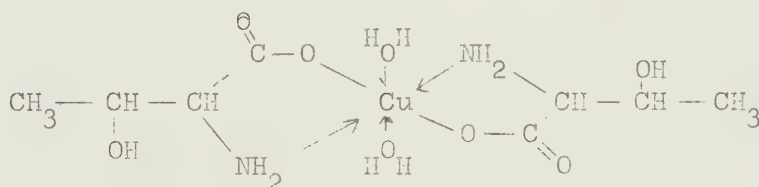
L'hydroxyde de cuivre est ensuite ajouté en excès à 20 ml d'une solution de L(-)Thréonine 0,2 M en solution dans l'eau. Immédiatement après addition du gel d'hydroxyde de cuivre le milieu réactionnel prend une coloration bleue intense. La préparation est agitée pendant 5 minutes en maintenant le pH à 7,5 par addition d'une solution de soude 0,1 N. L'excès d'hydroxyde de cuivre est éliminé par centrifugation. Les cristaux du complexe Thréonine-Cuivre sont obtenus par évaporation lente des solutions à une température inférieure à 40°C.

La pureté du complexe obtenu est vérifiée par chromatographie sur couche mince de Kieselgel G avec le solvant : Acétone-Eau (60/40) v/v. Après migration et séchage de la chromatoplaque, le complexe est détruit par pulvérisation de HCl 2N. La thréonine libérée est alors révélée à l'aide d'une solution alcoolique de

ninhydrine (0,1%) et de collidine (5%). Les taches de thréonine présentent une coloration violette caractéristique. Le cuivre est localisé par pulvérisation d'une solution de diéthylldithiocarbamate de zinc à 0,015% dans du CCl_4 (coloration jaune).

Le complexe obtenu se manifeste par une tache unique en chromatographie (Fig. 6) ce qui nous donne une bonne présomption de sa pureté. De plus, la bande à 610 nm du spectre d'absorption dans le visible est caractéristique des complexes hydratés de cuivre et d'acides aminés.

D'après MALDONADO et Coll. (79) la structure de ce complexe fait apparaître un ion cuivrique salifié et chélaté par 2 molécules de thréonine et 2 molécules d'eau :



XI. --2 -- Complexe radioactif ^{14}C -Thréonine-Cuivre.

Le complexe radioactif ^{14}C -thréonine-cuivre a été préparé selon le même mode opératoire que le complexe non actif.

Nous utilisons pour cela 10 ml d'une solution de ^{14}C -thréonine (60 milliCuries par mM) dans HCl 0,01N fournie par le Commissariat à l'Energie Atomique (C E A).

XII -- Mesure de la radioactivité

XII -- 1 -- Principe

La mesure des désintégrations est obtenue à l'aide d'un compteur à flux gazeux S.A.I.P. dont la chambre d'ionisation est

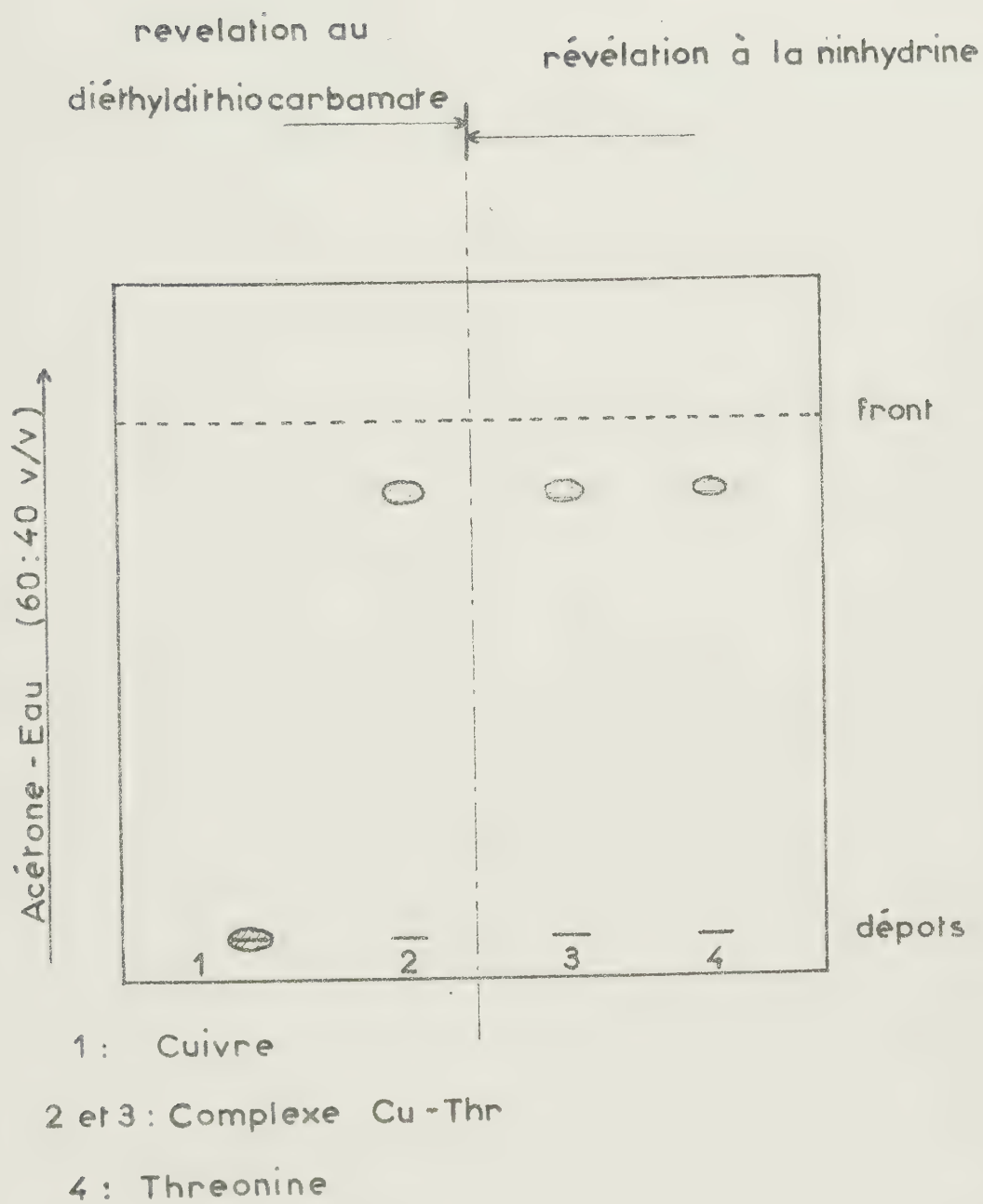


Fig.6 - Chromatographie sur couche mince de Kieselgel G

balayée par un mélange gazeux formé de 10% de méthane et de 90% d'argon, ce gaz s'ionisant sous l'action de la radiation émise.

XII - 2 - Comptage.

.....

Les solutions radioactives contenant la ^{14}C -thréonine sont préalablement évaporées dans des coupelles de 35 mm de diamètre par séchage à l'aide d'une lampe à infra-rouges.

La radioactivité des échantillons de mycélium peut être directement déterminée par comptage après filtration sur membrane Millipore SA (1,2 μ - 25mm de diamètre). A cet effet le mycélium filtré, est lavé deux fois à l'eau distillée puis séché avec la membrane de filtration dans une coupelle à l'aide d'une lampe I.R. pendant une nuit.

XIII - Etude cinétique

Les études cinétiques du transport du cuivre, de la thréonine et du complexe thréonine-cuivre ont été conduites de manière identique.

XIII - 1 - Etude du processus de pénétration.

.....

On ajoute des quantités variables de cuivre à une quantité constante de mycélium (1 g exprimé en poids humide) provenant d'une culture dans un fermenteur NBS de 4 litres. Le milieu de croissance est le milieu de WATSON, déjà cité, mais dépourvu de cuivre.

Après 70 heures de culture, en fin de phase de croissance exponentielle, la culture est arrêtée et le mycélium est filtré sur tissu. On prélève des quantités aliquotes de 1 g de mycélium humide que l'on répartit dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 40 ml de milieu de WATSON frais, sans cuivre.

Les erlenmeyers sont alors remis sur l'agitateur pendant 30 minutes pour permettre au mycélium de se réadapter au nouveau mi-

-lieu . Ce temps de réadaptation est porté à une heure quand on emploie des inhibiteurs métaboliques (2-4 dinitrophénol, nitrure de sodium, chloramphénicol,...) pour permettre à ces substances d'exercer leur activité inhibitrice.

A chaque erlenmeyer on ajoute ensuite 2 ml d'une solution du substrat choisi (Cu^{2+} sous forme de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, complexe Thréonine cuivre,...) à des concentrations variables. Après un temps d'incubation variable, on recueille le mycélium de chaque erlenmeyer par filtration sur membrane Millipore (25 ca. RA 1,2 μ).

Le mycélium est finalement séché à l'étuve à 60°C pendant 12 heures, et minéralisé pour la détermination analytique du cuivre "intracellulaire" transporté .

Remarque : Dans le cas de l'utilisation de la ^{14}C -thréonine et d'une manière générale de produits onéreux (Ouabaine, Olygomycine,...) on utilise des quantités de milieu, de mycélium et de produits dix fois plus faibles.

XIII - 2 - Etude du processus d'exsorption.

La quantité nécessaire de mycélium, récolté en phase de croissance exponentielle à partir d'une culture en fermenteur NBS, est remise en suspension dans du milieu de culture frais contenant des quantités variables de cuivre (ions Cu^{2+} ou complexe thréonine-cuivre). Au bout de 2 heures et demie d'incubation, le mycélium est saturé en cuivre; on le recueille par filtration sur tissu puis on le répartit dans des erlenmeyers de 100 ml à raison de 1 g de mycélium humide pour

- 50 ml de milieu de WATSON (glucose 10 g/l; sans cuivre)
- ou - 50 ml de milieu de WATSON (glucose 0 g/l ; sans cuivre)
- ou - 50 ml d'eau distillée

Pour cette étude, il aurait été souhaitable d'utiliser un milieu exempt de carbone, cependant les risques de choc osmotique nous ont incités à choisir un milieu contenant encore 10 g de glucose par litre.

On effectue ensuite des prélèvements en fonction du temps afin de préciser la cinétique d'exsorption du cuivre.

R E S U L T A T S

I - Influence de la concentration en cuivre, du milieu de culture, sur la croissance d'A.niger

Pour effectuer cette étude nous avons procédé à 6 expériences en faisant varier la teneur en cuivre du milieu de 0,5 à 750 mg.l⁻¹.

Les autres conditions de culture ont été précisées dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

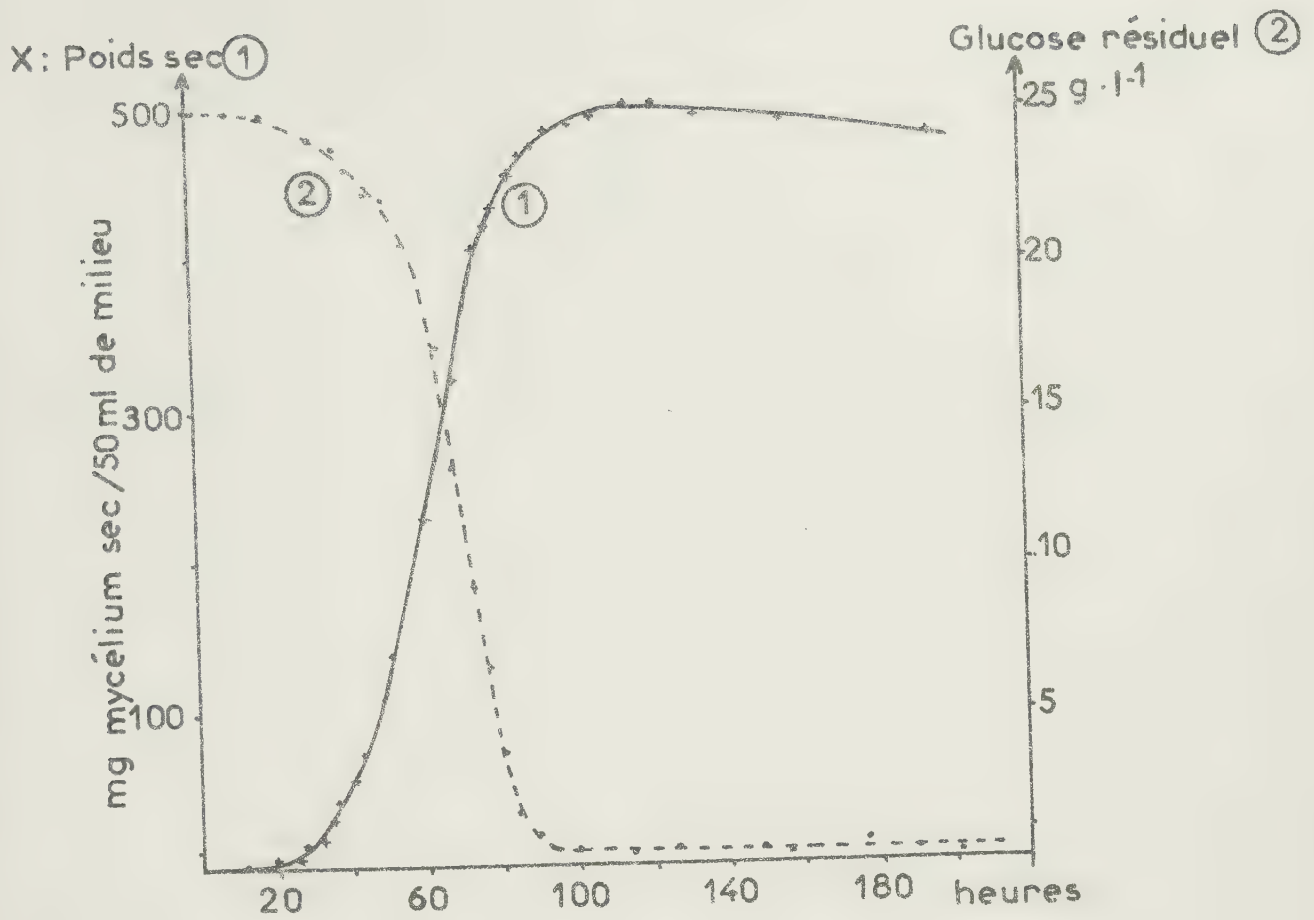
On répartit la suspension de spores contenant $6,6 \times 10^6$ spores par ml entre les différents erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu et à raison de 1 ml par récipient. Chaque expérience correspondant à une concentration donnée en cuivre, exige au minimum l'emploi de trente erlenmeyers.

La croissance du champignon est exprimée par la courbe d'accroissement du poids sec en fonction du temps.

Pour confirmer ces résultats nous avons suivi également la diminution de la teneur en glucose du milieu de culture.

Référence de la culture	Concentration en Cu ²⁺ dans le milieu mg.l ⁻¹	N° des Fig.	Pages
1	0,5 (milieu normal)	3 et 4	22
2	50	7	40
3	100	8	41
4	250	9	42
5	500	10	43
6	750	11	44

D'autre part pour faciliter l'interprétation des résultats fournis par les courbes de croissance nous avons tracé ces mêmes graphes en

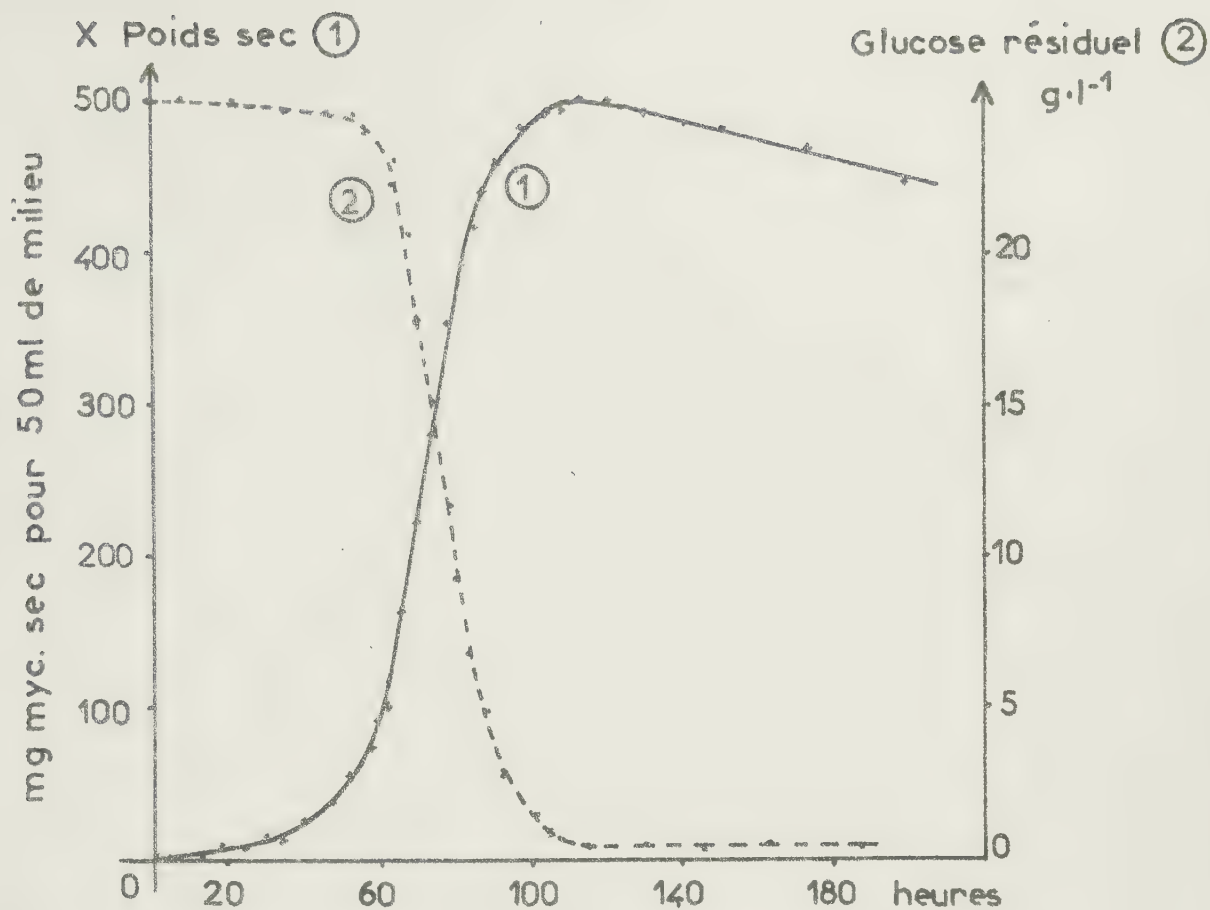


a. Courbes de croissance

b.



Fig. 7. Etude de la croissance d'*A. niger*. Milieu de culture contenant 50 mg Cu²⁺/l.



a. Courbes de croissance

b.

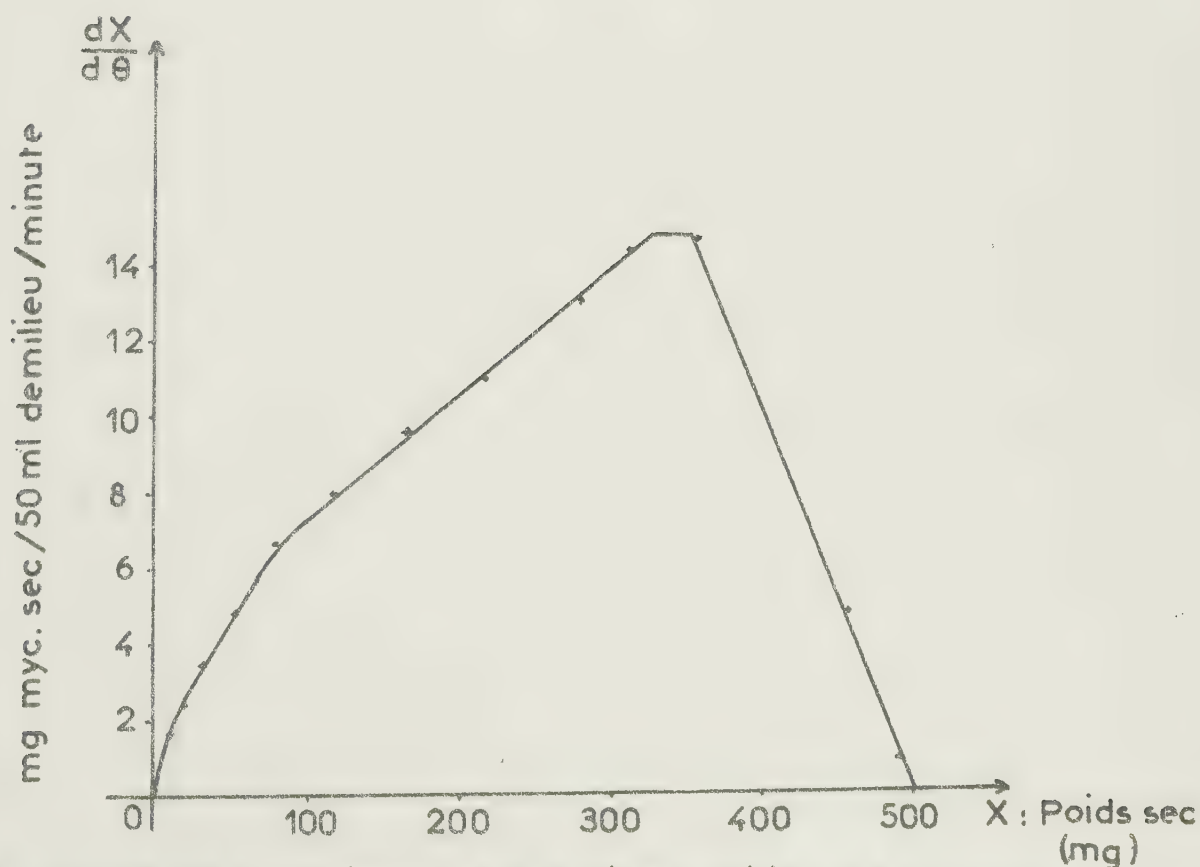
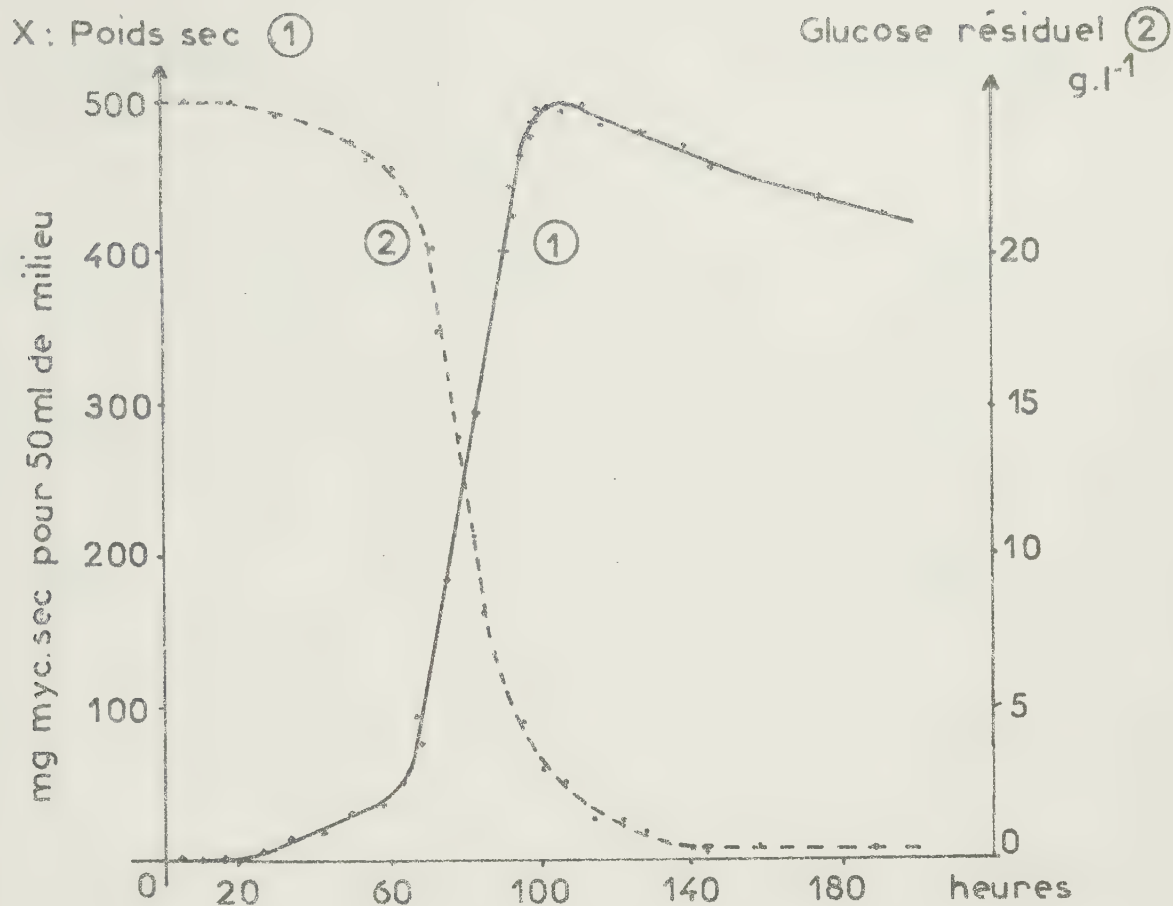


Fig.8 , Etude de la croissance d'*A.niger*. Milieu de culture contenant 100 mg Cu²⁺/l.



a. Courbes de croissance

b.

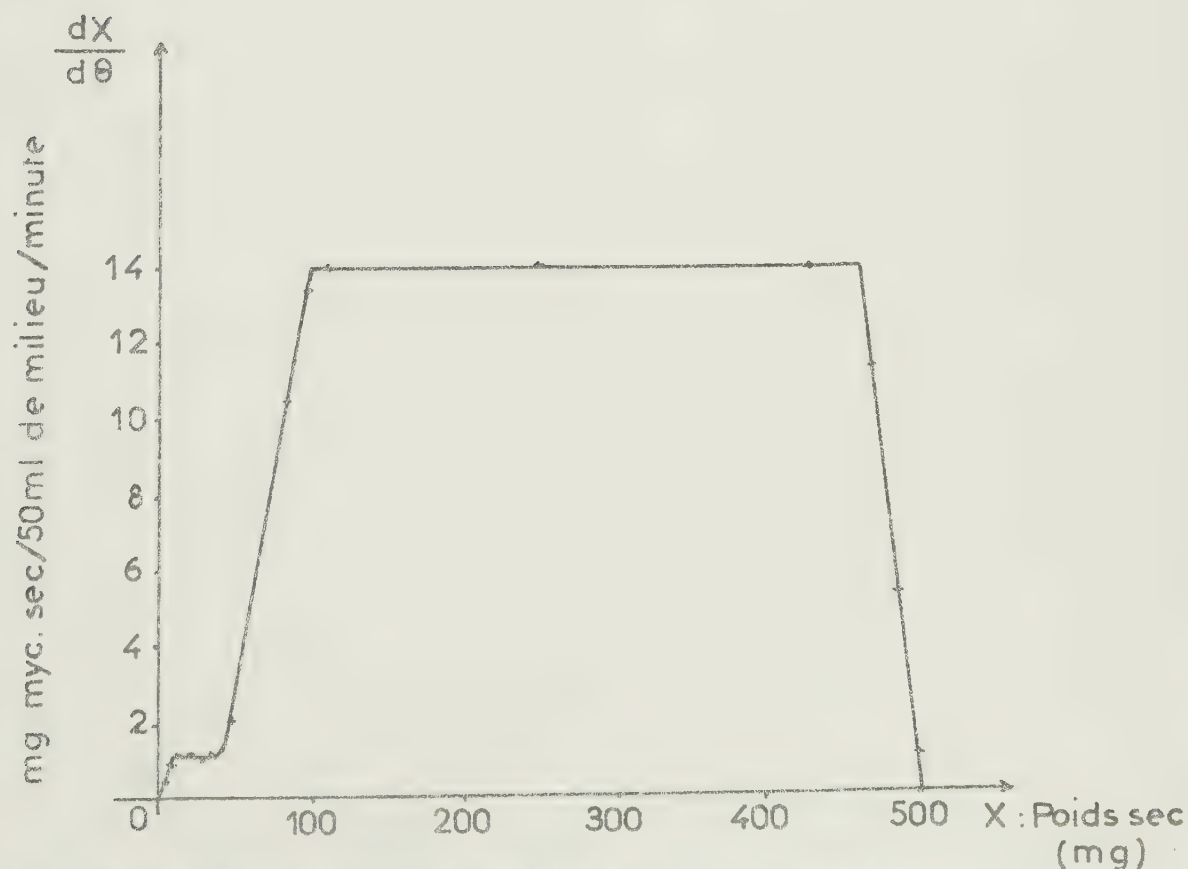
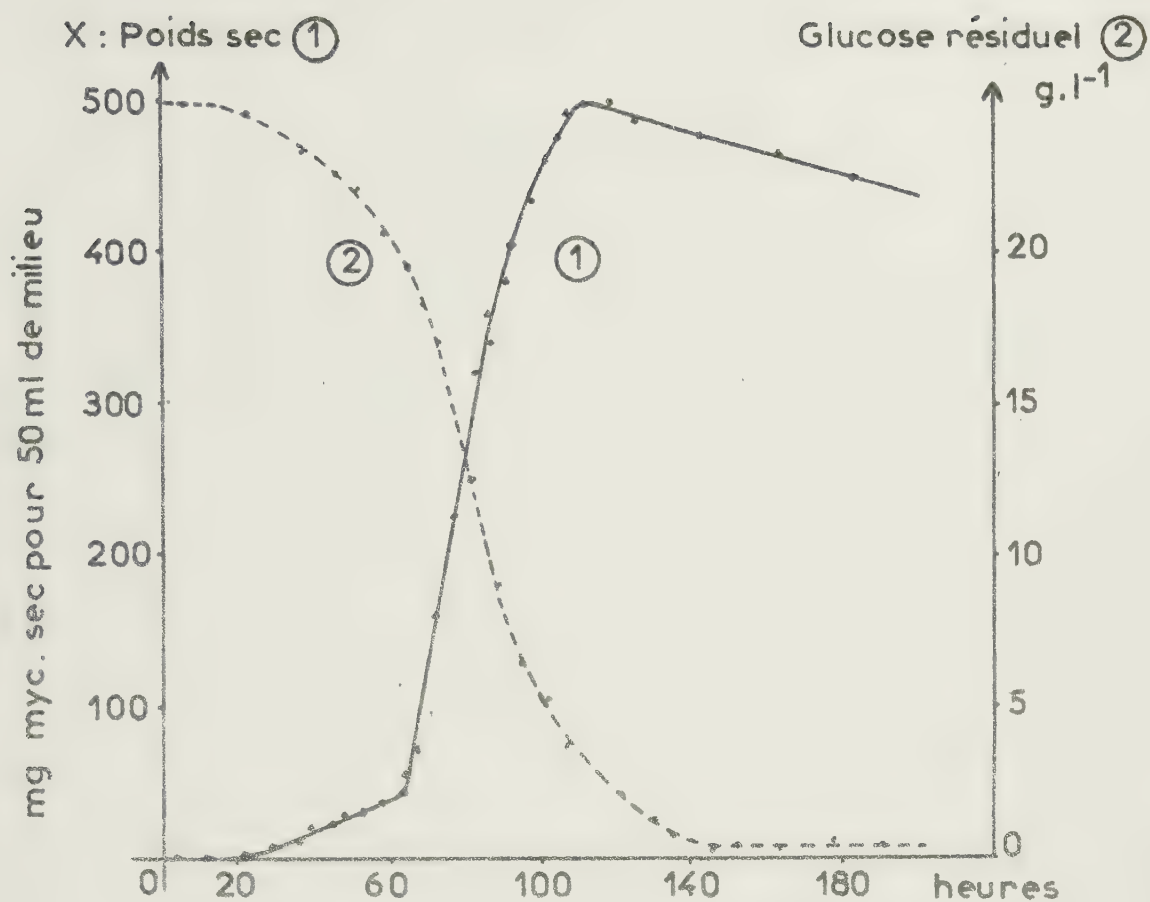


Fig 10. Etude de la croissance d'*A. niger*. Milieu de culture contenant 500 mg Cu²⁺/l.



a. Courbes de croissance

b.

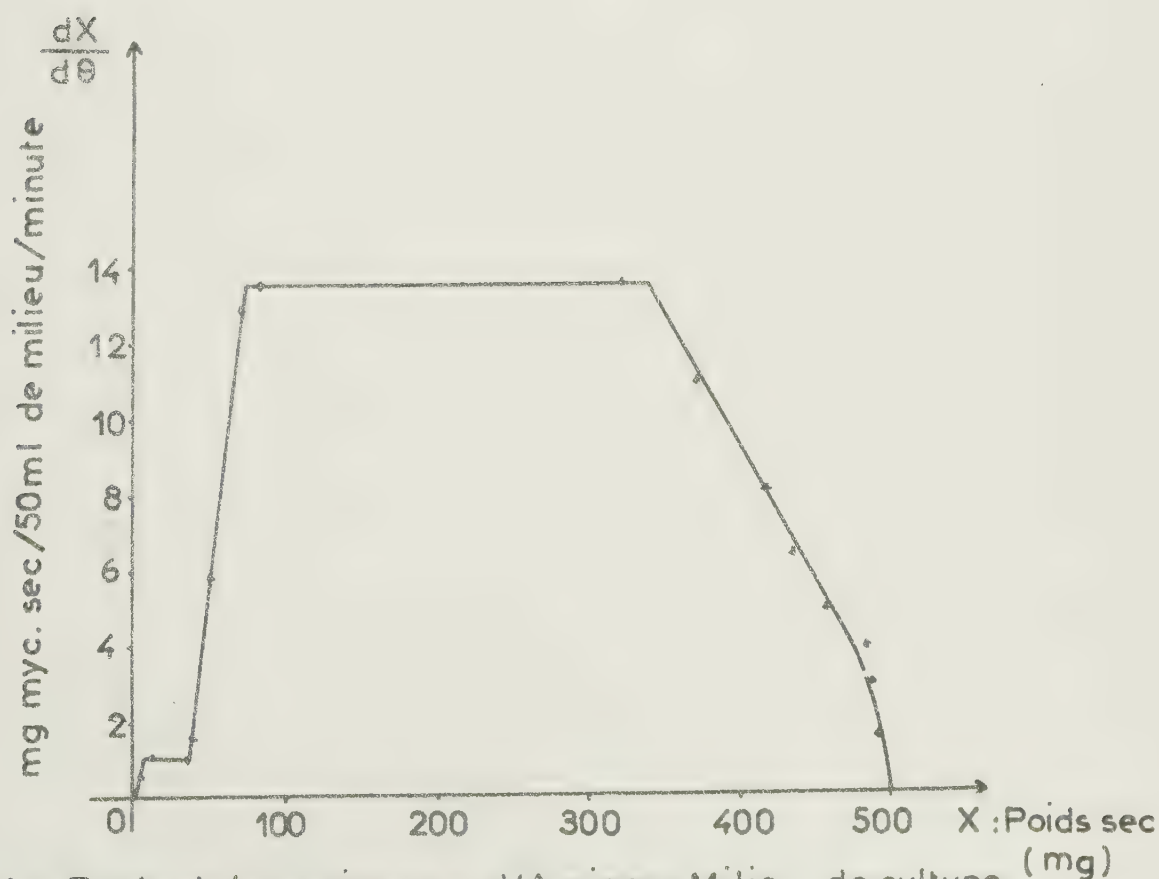
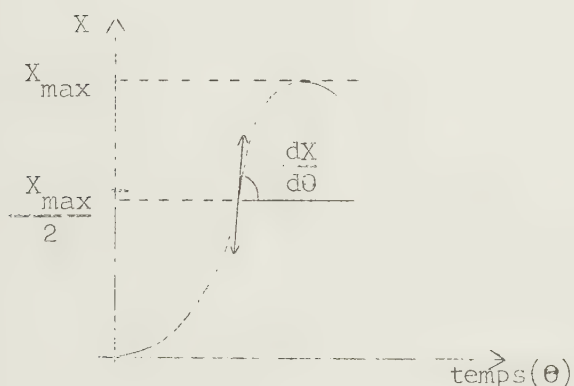


Fig. 11 - Etude de la croissance d'*A. niger* - Milieu de culture contenant 750 mg Cu²⁺/l.

coordonnées semi-logarithmiques (Fig. 12bis).

Un premier examen des courbes de croissance permet de montrer que les ions cuivriques n'affectent pas la quantité totale de mycélium obtenu à partir de 50 ml de milieu de culture pour les conditions de l'expérience (environ 500 mg de mycélium sec).

De plus on peut remarquer que la vitesse de croissance $\frac{dX}{d\theta}$ au cours de la phase principale n'est pas modifiée de façon significative. En



effet pour une masse de mycélium sec correspondant à la moitié de la production maximale (soit 250 mg de mycélium sec), les variations de vitesse demeurent négligeables ce qui se traduit bien par le parallélisme de la partie médiane des courbes de

croissance (Fig. 12).

Concentration en Cu^{2+} dans le milieu (mg.l^{-1})	$\left(\frac{dX}{d\theta}\right)_{250}$ en mg de mycélium sec pour 50 ml et par heure
0,5	12,5
50	12,5
100	14,5
250	14,0
500	14,0
750	13,5

Cependant l'action du cuivre se traduit par un retard dans la croissance qui est principalement dû à un ralentissement de plus en plus accusé de la phase d'accélération.

En raison de la difficulté que l'on éprouve pour déterminer avec précision la durée réelle de cette phase, nous avons précisé l'action du cuivre par la mesure du retard à l'utilisation totale de la source

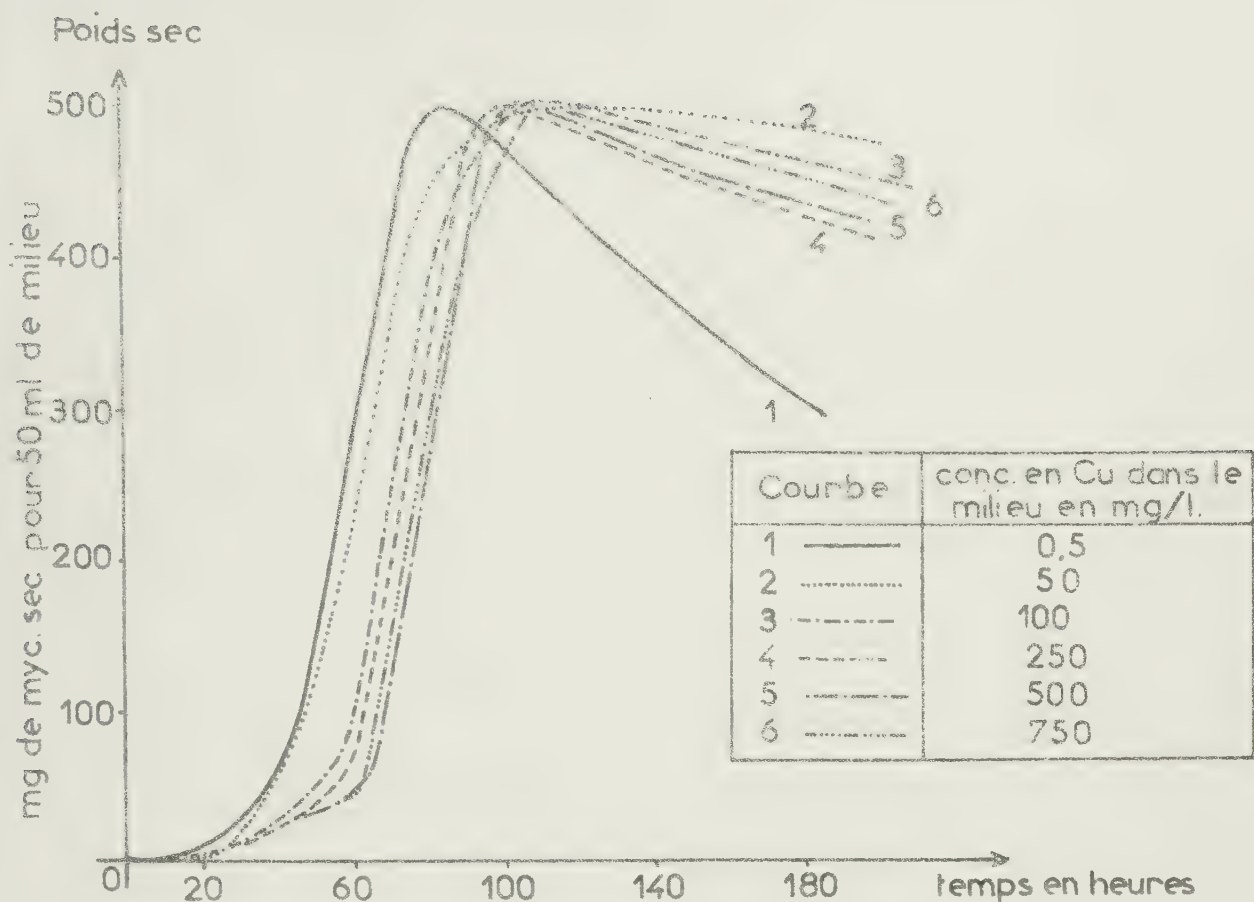


Fig.12 _ Courbes de croissance (poids sec)

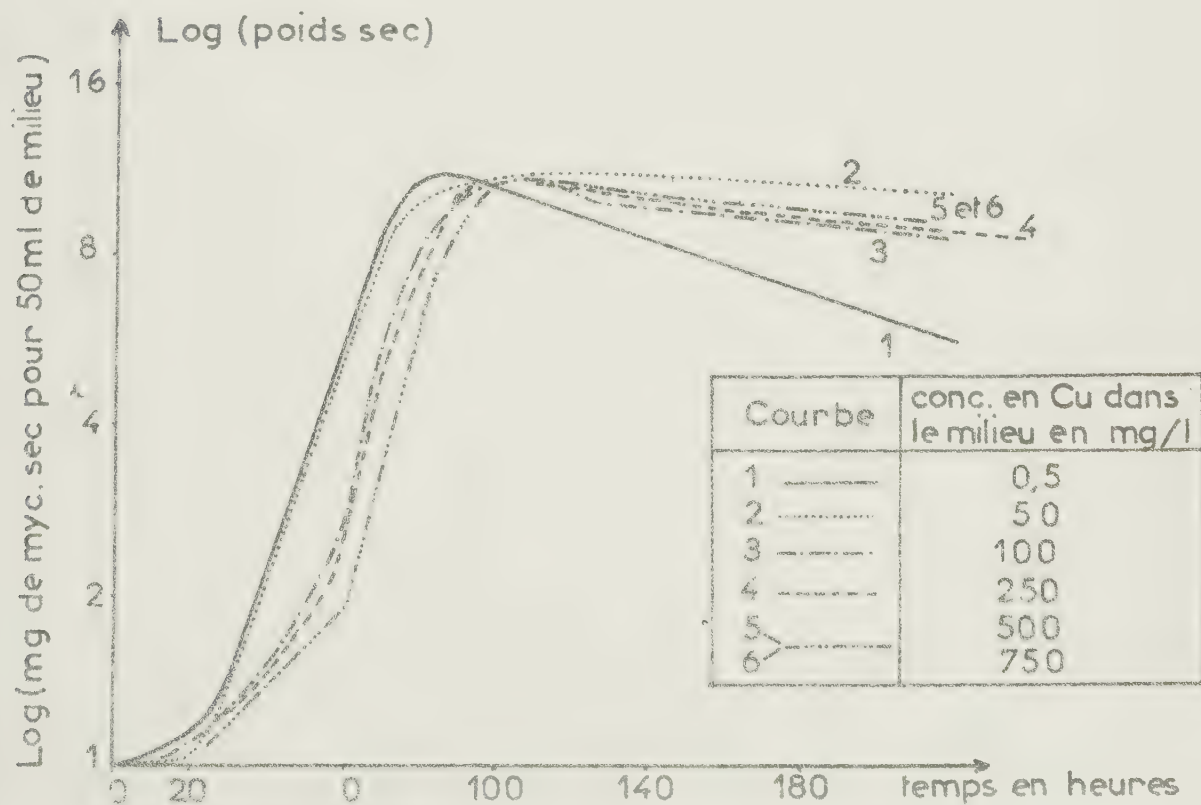


Fig.12 bis _ Courbes de croissance (poids sec): coordonnées semi-logarithmiques

carbonée. Cette approximation n'est valable qu'en raison du parallélisme observé entre les différentes phases principales.

Si on porte, en coordonnées semi-logarithmiques, le retard à la consommation du glucose en ordonnée et la concentration en Cu^{2+} en abscisse (Tableau n°3 et Fig.13), on obtient une droite.

Concentration en cuivre dans le milieu en mg.l^{-1}	Temps nécessaire à l'utilisation totale du glucose (en heures)	Retard (en heures)
0,5	86	0
50	92	6
100	112	26
250	129	43
500	140	54
750	145	59

Tableau n°3

Par extrapolation on détermine le point d'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses, ce qui permet de déterminer la concentration minimale en cuivre au-dessous de laquelle le retard à la consommation totale du glucose est indépendant de la concentration en cet élément : soit 30 mg.l^{-1} .

La droite étant de la forme :

$$\theta = k \text{ Log}(\text{Cu}^{2+}) + k'$$

On détermine par voie graphique les valeurs respectives de k et k'

$$k = 44,3 \text{ H.}$$

$$k' = -65,5 \text{ H}$$

La vitesse de croissance lors de la phase principale est peu perturbée, l'action du cuivre semble surtout influencer la phase d'accélération. Il apparaît comme vraisemblable que son action inhibitrice s'exerce plus particulièrement sur la physiologie de la germination des spores d'*A.niger*. Le retard enregistré, en début de croissance, semble donc correspondre à un temps de détoxification au moment de la germination.

D'après l'observation des courbes de croissance (Fig. 3-4-7-8-9-10-11-12 et 12bis) on est amené à distinguer deux processus d'accroissement de la biomasse.

Les courbes 1 et 2 des figures 12 et 12bis présentent une phase principale à caractère exponentiel bien affirmé.

Par contre les courbes 4, 5 et 6 des mêmes figures n'admettent pas une représentation linéaire en coordonnées semi-logarithmiques, la phase principale n'est plus exponentielle mais linéaire : il s'agit d'une phase de croissance à vitesse constante.

La courbe 3 (100 mg Cu^{2+} par litre) est intermédiaire entre les deux types précédents.

On retrouve ce phénomène quand on observe les courbes dérivées (Fig. 7 à 11). La vitesse de croissance spécifique correspondant aux courbes 1 et 2 s'accroît linéairement (cas d'une croissance exponentielle), tandis que dans le cas des courbes 4, 5 et 6 elle demeure constante pendant la plus grande partie de la phase principale (cas d'une croissance à vitesse constante). Par sa position intermédiaire la courbe n°3 permet de mettre en évidence successivement ces deux processus.

I-1- Etude détaillée des courbes du premier groupe (Courbes 1 et 2)

Comme nous venons de le voir, les courbes 1 et 2 de la figure 12 montrent tous les caractères d'une croissance de type exponentiel.

On y distingue les phases suivantes :

Phases	Courbe 1 (0,5 mg Cu.l^{-1})	Courbe 2 (50 mg Cu.l^{-1})
de latence		0 à 10 H
d'accélération	0 à 30 H	10 à 30 H
exponentielle	30 à 70 H	30 à 70 H
de ralentissement	70 à 80 H	70 à 100 H
stationnaire	80 à 92 H	100 à 145 H
de déclin	92 H	145 H

Par rapport à une croissance normale on est tenté de dire que le cuivre exerce une action inhibitrice qui se manifeste par l'apparition d'une phase de latence d'environ dix heures.

Les phases d'accélération et exponentielle sont très voisines. Tout se passe comme si le champignon, après avoir été retardé dans son développement se comportait de manière identique dans les deux cas.

Par contre la différence est plus nette lors des trois dernières phases. Les phases de ralentissement et stationnaire sont nettement plus longues dans le cas de la présence de cuivre (30 heures et 45 heures contre 10 heures et 12 heures respectivement).

De plus le phénomène de lyse est beaucoup plus rapide dans le cas de la courbe 1. Tout se passe comme si le cuivre "protégeait" les structures mycéliennes des enzymes protéolytiques qui interviennent au cours de la phase de déclin. Cette observation rappelle la remarque de BRAUNS et LONTIE (79) qui ont observé que le cuivre inhibe l'hydrolyse partielle de l'hémocyanine d'escargot par la trypsine et la chymotrypsine.

I-2- Etude détaillée des courbes du deuxième groupe (courbes 4, 5 et 6 Fig. 12)

Contrairement aux deux courbes précédentes nous avons ici affaire à des croissances à vitesse constante.

Phases	Courbe 4 250 mg.l ⁻¹	Courbe 5 500 mg.l ⁻¹	Courbe 6 750 mg.l ⁻¹
de latence	0 à 10 H	0 à 15 H	0 à 15 H
d'accélération	10 à 61 H	15 à 67 H	15 à 65 H
linéaire	61 à 88 H	67 à 89 H	65 à 81 H
de ralentissement	88 à 95 H	89 à 98 H	81 à 107 H
stationnaire	95 à 112 H	98 à 115 H	107 à 126 H
de déclin	112 H	115 H	126 H

Il existe toujours une phase de latence (10 à 15 heures) suivie par une phase d'accélération qui présente la particularité d'être en partie linéaire ce qui est confirmé par le premier plateau observé sur les courbes dérivées (Fig. 9, 10 et 11). Ce processus linéaire est suivi d'une partie de courte durée durant laquelle la vitesse de croissance spécifique augmente linéairement. Cette phase d'accélération est suivie de la phase linéaire qui correspond au deuxième plateau des courbes dérivées. Le passage de la phase d'accélération à la phase linéaire est bien marqué en représentation semi-logarithmique par un point de rebroussement (Fig. 12bis) surtout remarquable pour les concentrations supérieures ou égales à 500 mg de cuivre par litre.

Il y a lieu de remarquer encore l'allongement de la durée de la phase de ralentissement en fonction de la teneur en cuivre.

Là encore, la lyse du mycélium est nettement retardée en présence de cuivre.

I-3- Cas de la courbe n°3 (100 mg Cu .l⁻¹).

Cette courbe, comme nous l'avons déjà signalé, peut être considérée comme intermédiaire entre les deux groupes précédents.

L'observation de cette courbe en coordonnées normales et semi-logarithmiques (Fig. 8, 12 et 12bis) semble en faveur du deuxième groupe; cependant l'étude de la courbe dérivée nous montre que la phase d'accélération n'est pas linéaire et que la phase exponentielle existe malgré la présence d'une courte phase de croissance à vitesse constante.

Tous ces facteurs nous conduisent à conclure que nous avons bien affaire à une courbe de transition.

A l'aide des différentes courbes et en particulier de la courbe dérivée on obtient le tableau suivant :

Phase de latence	0 à 10 Heures
" d'accélération	10 à 58 H
" exponentielle	58 à 76 H
" linéaire	76 à 80 H
" de ralentissement	80 à 103 H
" stationnaire	103 à 130 H
" de déclin	130 H

En résumé, ces expériences montrent que le cuivre, dans le domaine des concentrations étudiées, n'est pas toxique pour le champignon, puisque dans tous les cas on obtient d'une part la même quantité de mycélium produit, et d'autre part, des phases principales dont les vitesses de croissance spécifique sont sensiblement égales ; cependant le cuivre modifie de façon notoire le processus de croissance du champignon.

Le cuivre pénètre donc certainement dans la cellule, c'est pourquoi nous nous attacherons ensuite à déterminer la cinétique de fixation du cuivre par le mycélium.

II - Etude cinétique de la fixation du cuivre par le mycélium d'A.niger :

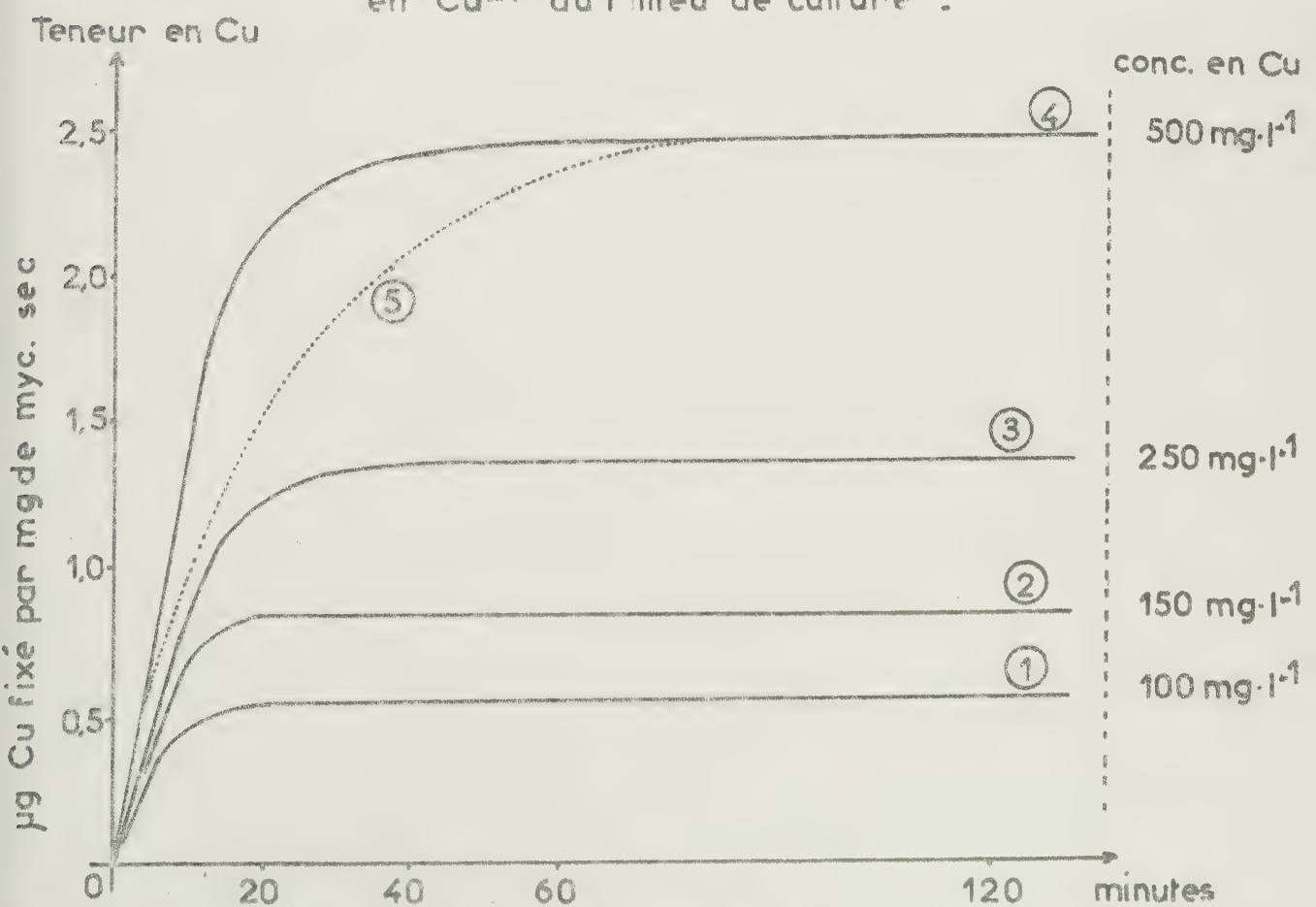
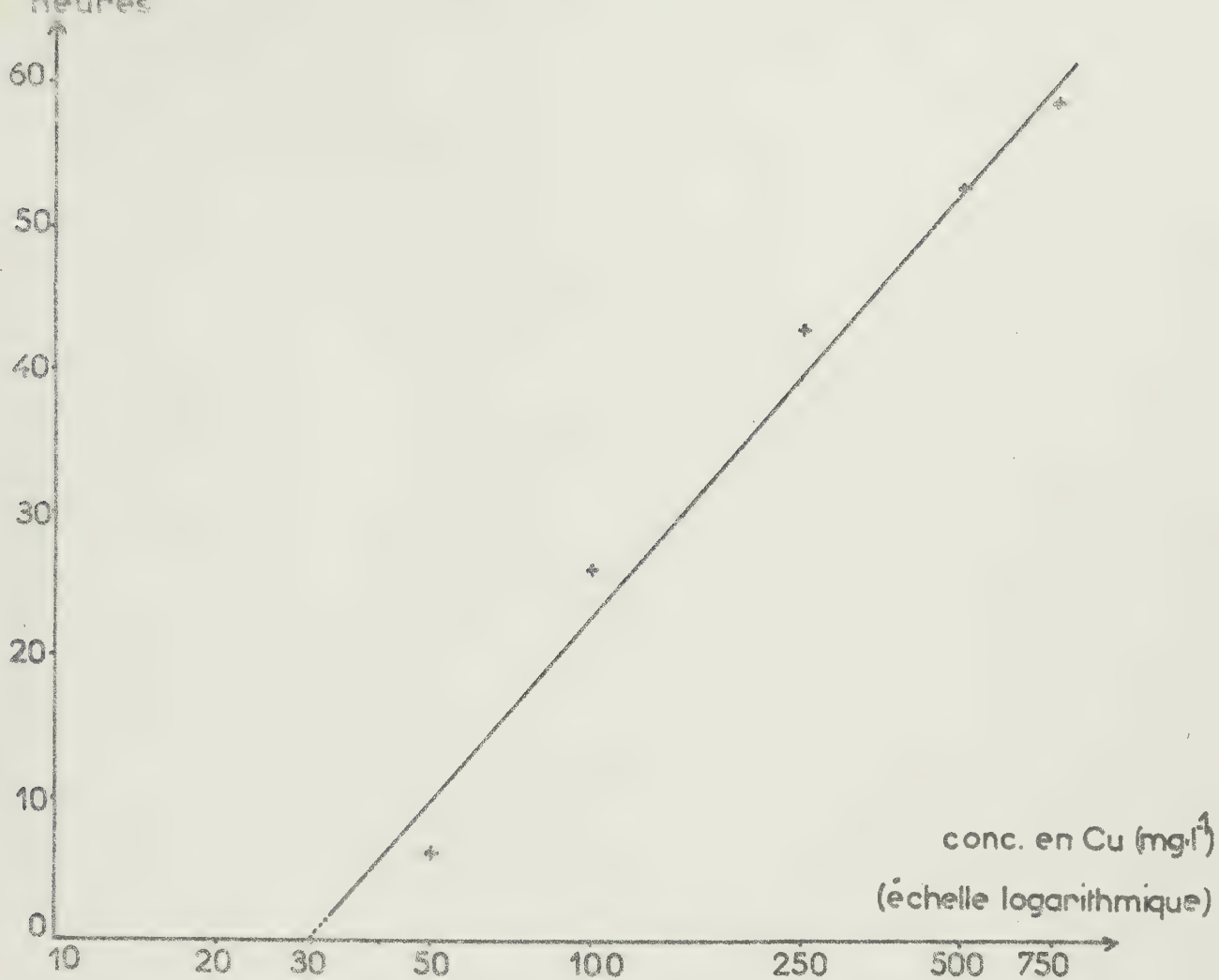
Absorption et exsorption du cuivre sous forme libre ou chélatée avec un acide aminé.

II-1 - Etude de la fixation du cuivre sous forme ionique par le mycélium

II-1-1 - Cas de fortes concentrations en cuivre.

Nous avons suivi, en fonction du temps, la fixation du cuivre par le mycélium selon le processus expérimental décrit plus haut. Nous avons opéré avec 4 concentrations différentes de Cu^{2+} par litre : 100 , 150 , 250 et 500 mg.l^{-1} .

Si on porte, en fonction du temps, la quantité de cuivre fixé par mg de mycélium sec sur un graphique, on obtient les résultats exprimés par la figure 14 .



Chaque graphe comporte deux parties rectilignes, la première d'une durée inférieure à 15 minutes permet d'exprimer la vitesse initiale de fixation du cuivre ; la seconde, parallèle à l'axe des temps, correspond à l'état d'équilibre qui s'établit entre le milieu extérieur et le mycélium.

De plus , si on porte sur un graphe : en ordonnée les teneurs en cuivre fixé à l'équilibre en fonction de la concentration extérieure en cuivre, on obtient une droite dont la pente correspond au rapport $\frac{(Cu_{int})}{(Cu_{ext})} = K$, cette valeur K est une constante pour la température d'expérimentation (27°C) (Fig. 15).

Conc. ext. en Cu^{2+} ($mg.l^{-1}$)	Teneur en Cu du mycélium à l'équilibre
500	2,48 $\mu g Cu.mg^{-1} myc.sec.$
250	1,33 "
150	0,82 "
100	0,64 "

Par ailleurs nous observons une relation de proportionnalité entre les vitesses initiales de fixation du cuivre par le mycélium et les concentrations du milieu (Fig. 16). Ceci nous permet de donner une expression de la vitesse initiale :

$$V = k.C_{ext}$$

ou V = vitesse initiale de fixation du cuivre

C_{ext} = Concentration externe en cuivre

et k = pente de la droite.

Il s'agit ici d'une cinétique d'ordre 1, qui s'écarte, apparemment, de l'expression classique de la vitesse de transport d'un ion mettant en jeu un transporteur :

$$v = \frac{V_m (C_e - C_i)}{(C_e - C_i) + K_m}$$

{

C_e : Conc. du milieu extérieur

C_i : Conc. du milieu interne

V_m : Vitesse maximale de transport

K_m : Constante cinétique .

Teneur en Cu à l'équilibre

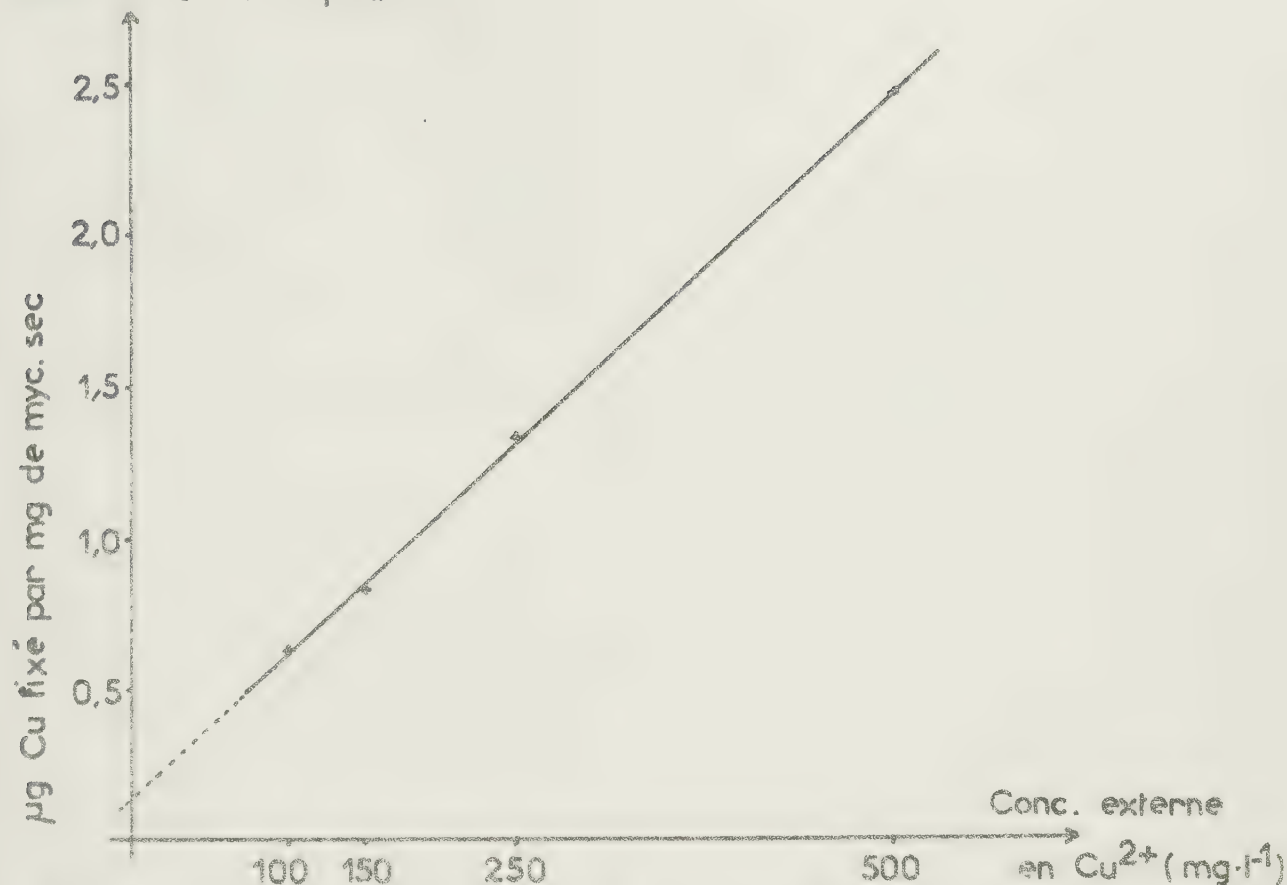


Fig.15 - Teneur en Cu à l'équilibre en fonction de la concentration externe en Cu²⁺.

Vitesse initiale

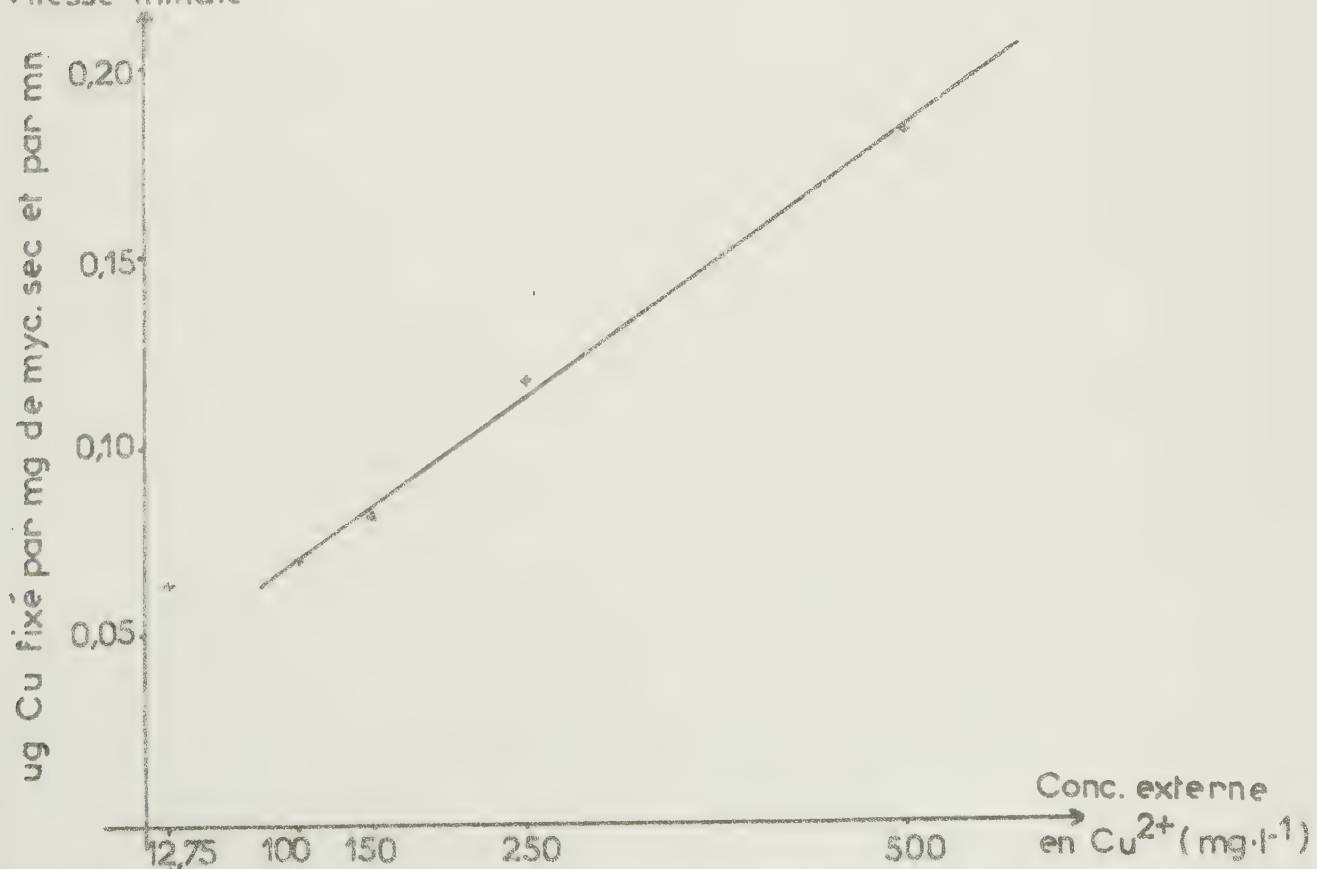
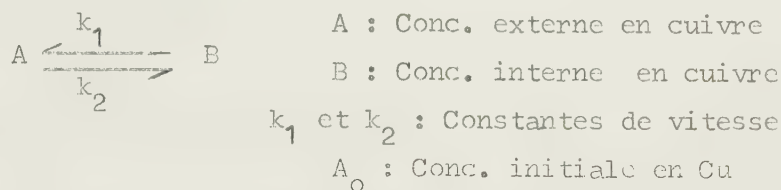


Fig.16 - Vitesse initiale d'entrée du Cu en fonction de la concentration externe en Cu²⁺.

Selon les résultats précédents, le schéma mathématique le plus simple auquel on peut penser est un processus réversible qui se traduit par l'équilibre :



La vitesse d'entrée du cuivre s'exprime par l'expression :

$$-\frac{dA}{d\theta} = k_1 A - k_2 B \quad \text{or } A_0 = A + B$$

Soit

$$-\frac{dA}{d\theta} = k_1 A - k_2 (A_0 - A) = A(k_1 + k_2) - k_2 A_0$$

En intégrant sans deuxième membre:

$$-\frac{dA}{A} = (k_1 + k_2) d\theta$$

Soit $\therefore \text{Log } A = (k_1 + k_2) \theta + \text{cste}$

et $A = K e^{-(k_1 + k_2)\theta}$ (1)

Evaluons K :

$$\frac{dA}{d\theta} + A(k_1 + k_2) = k_2 A_0$$

D'où : $e^{-(k_1 + k_2)\theta} \frac{dK}{d\theta} = k_2 A_0$

et $dK = e^{(k_1 + k_2)\theta} \cdot k_2 A_0 \cdot d\theta$

soit $K = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} \cdot e^{(k_1 + k_2)\theta} + \text{cste}$

D'où en remplaçant K par sa valeur dans (1) :

$$A = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} + K' e^{-(k_1 + k_2)\theta} \quad (2)$$

Les conditions initiales sont les suivantes :

pour $\theta = 0$ on a $A = A_0$ (a)

et pour $\theta \rightarrow \infty$ on a $A \rightarrow A_{\text{eq}}$ (b)

D'après (a) on obtient dans (2) :

$$K' = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} \quad \text{soit } A = \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2} + \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)\theta} \quad (3)$$

et dans cette expression en tenant compte des conditions (b) on obtient :

$$A_{eq} \longrightarrow \frac{k_2 A_0}{k_1 + k_2}$$

On aura donc

$$B_{eq} \longrightarrow A_0 \left(1 - \frac{k_2}{k_1 + k_2} \right) = \frac{k_1 A_0}{k_1 + k_2} \quad (4)$$

On retrouve bien la proportionnalité entre la quantité de Cu fixé par le mycélium et la concentration initiale en cuivre du milieu extérieur indiquée par la figure 16 . La pente de la droite a donc pour valeur : $\frac{k_1}{k_1 + k_2}$

D'autre part on a : $B = A_0 - A$

$$\begin{aligned} \text{soit } B &= A_0 \left(1 - \frac{k_2}{k_1 + k_2} + \frac{k_1}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)\theta} \right) \\ B &= A_0 \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} + \frac{k_2}{k_1 + k_2} e^{-(k_1 + k_2)\theta} \right) \end{aligned} \quad (5)$$

De cette dernière équation, on déduit la valeur de la vitesse initiale du transport :

$$\frac{dB}{d\theta} \xrightarrow{\theta \rightarrow 0} k_1 A_0$$

Là encore on vérifie le résultat de la figure 15. La pente de la droite représente donc k_1 .

D'après les figures 15 et 16 on peut alors déterminer les constantes de vitesse k_1 et k_2 .

$$k_1 = 2,85 \times 10^{-7} \text{ l.mg}^{-1} \text{ myc.sec} \cdot \text{mn}^{-1}$$

$$k_2 = 6,19 \times 10^{-2} \text{ l.mg}^{-1} \text{ myc.sec} \cdot \text{mn}^{-1}$$

Ce modèle mathématique n'est cependant pas parfait. On observe, toutefois, une bonne concordance pour l'expression de la vitesse initiale et de l'état d'équilibre entre la courbe expérimentale et la courbe calculée. La courbe 5 de la figure 14 , représentative de la relation (5) confirme bien cette observation.

Le transport étudié présente donc bien les caractères d'un processus diffusionnel exprimé par la loi de Fick :

$$v = k(C_e - C_i).$$

On ne peut pas exclure cependant l'éventualité d'un processus de diffusion facilitée qui ferait intervenir un transporteur dans le cas où $C_e - C_i$ serait beaucoup plus petit que K_m .

II-1-2 - Cas de faibles concentrations en cuivre

Pour de faibles concentrations en cuivre dans le milieu extérieur le problème s'avère plus complexe. Ainsi quand on passe d'une concentration externe de 500 mg.l^{-1} à $12,75 \text{ mg.l}^{-1}$ (40 fois moins) la vitesse initiale de pénétration du cuivre dans le mycélium passe de $0,184 \mu\text{g}$ de Cu fixé par minute à $0,063 \mu\text{g}$ de Cu fixé par minute (soit seulement trois fois moins) (Fig. 16) : on ne retrouve donc plus la relation de proportionnalité établie pour les concentrations élevées en cuivre.

Ces résultats nous font penser à l'existence probable d'un seuil en-dessous duquel la vitesse initiale varie avec la concentration externe selon une loi qui n'est plus linéaire. Ce seuil pourrait éventuellement coïncider avec le "remplissage" d'un compartiment cellulaire.

II-2 - Pénétration du cuivre, sous forme chélatée, dans le mycélium d'A.niger

Les ions cuivriques pénètrent donc dans les cellules d'A.niger par un processus diffusif. Etant donné la nature des constituants de la membrane ainsi que leur structure (30-31) nous avons pensé qu'en modifiant la charge électrique portée par le cation, nous pourrions obtenir des renseignements intéressants sur le processus de pénétration du cuivre.

Dans ce but, nous avons préparé le complexe thréonine-cuivre qui associe cet élément à un acide aminé et dont la structure chimique est bien définie ("Matériel et Méthodes" Chap. XI et (78)).

La formation de ce complexe est d'autant plus intéressante qu'elle modifie l'état d'hydratation de l'ion Cu^{++} et de ce fait tend à influencer la nature du processus de pénétration de cet élément au travers des structures lipoprotéiques de la membrane. On pourrait s'attendre, en outre, à une analogie de comportement entre le complexe thréonine-cuivre et les complexes résultant de la fixation de certains métaux alcalins et du fer par les cyclodepsipeptides.(64).

Comme dans le cas du cuivre libre et selon le même processus, nous avons suivi en fonction du temps la fixation du cuivre par le mycélium. Cette fixation est mesurée par absorption atomique. La pénétration de la thréonine, par contre, ne peut être mise en évidence que par utilisation de thréonine radioactive.

Il était donc nécessaire, avant d'étudier le processus de pénétration du complexe thréonine-cuivre, de préciser la nature du transport de la thréonine au travers de la membrane fongique.

II-2-1 - Nature du transport de la thréonine.

Nous avons suivi l'incorporation de la thréonine radioactive dans le mycélium en suspension dans le milieu de WATSON.

Les résultats sont rapportés à l'unité de poids sec car nous n'avons pas pu déterminer encore, avec une précision satisfaisante le volume de l'espace libre du mycélium.

Dans nos conditions expérimentales, la désintégration de $0,1 \mu\text{g}$ de thréonine radioactive correspond à 1000 impulsions par minute.

La figure 17 exprime les résultats obtenus pour trois concentrations différentes en thréonine : 273,75- 547,5 et 1095 mg de thréonine par litre. Ces conditions correspondent à des concentrations de 75, 150 et 300 mg de cuivre par litre quand on utilise le complexe thréonine-cuivre.

Pour vérifier que l'utilisation de la thréonine par la cellule

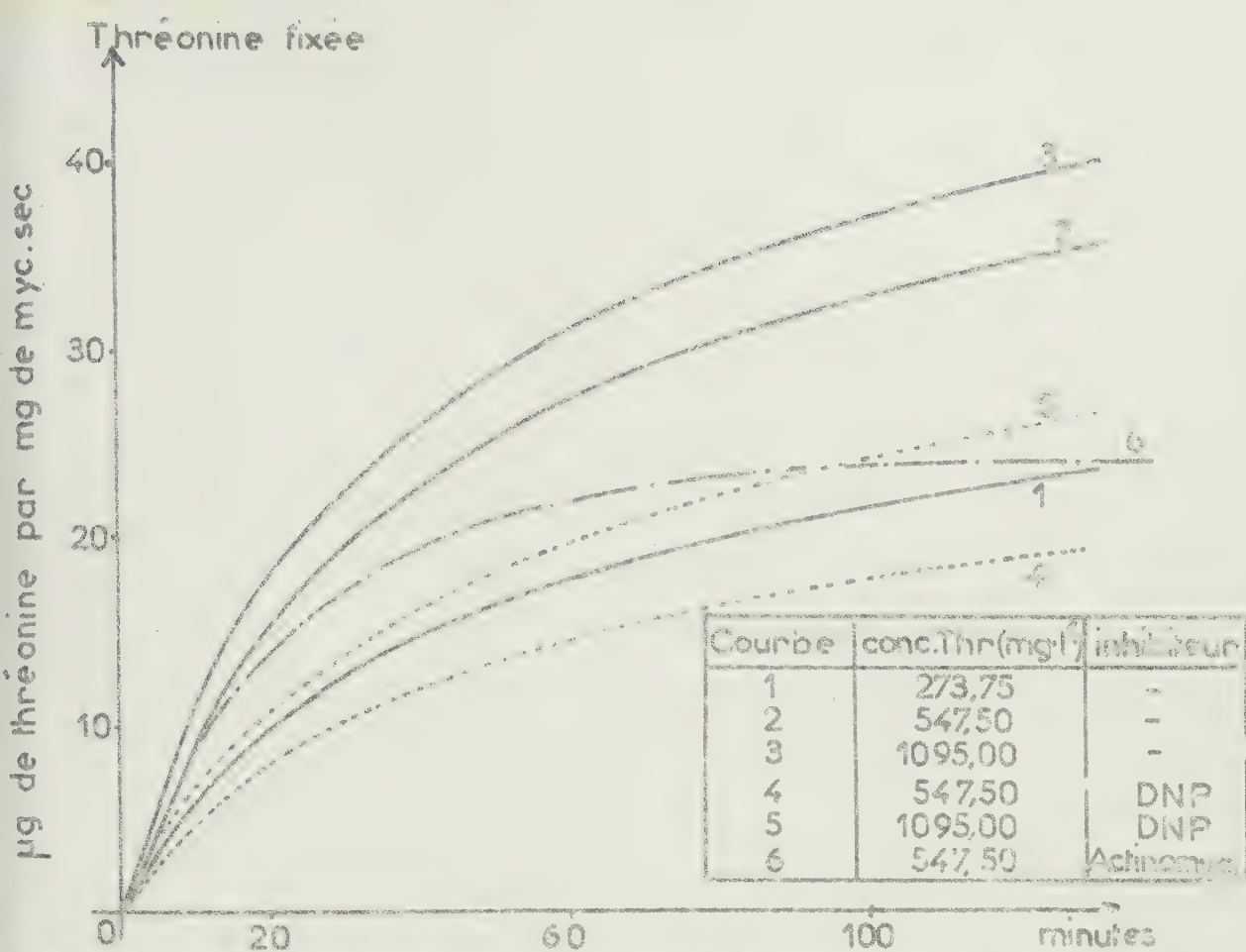


Fig.12. Transport de la thréonine (en présence ou non d'inhibiteur)

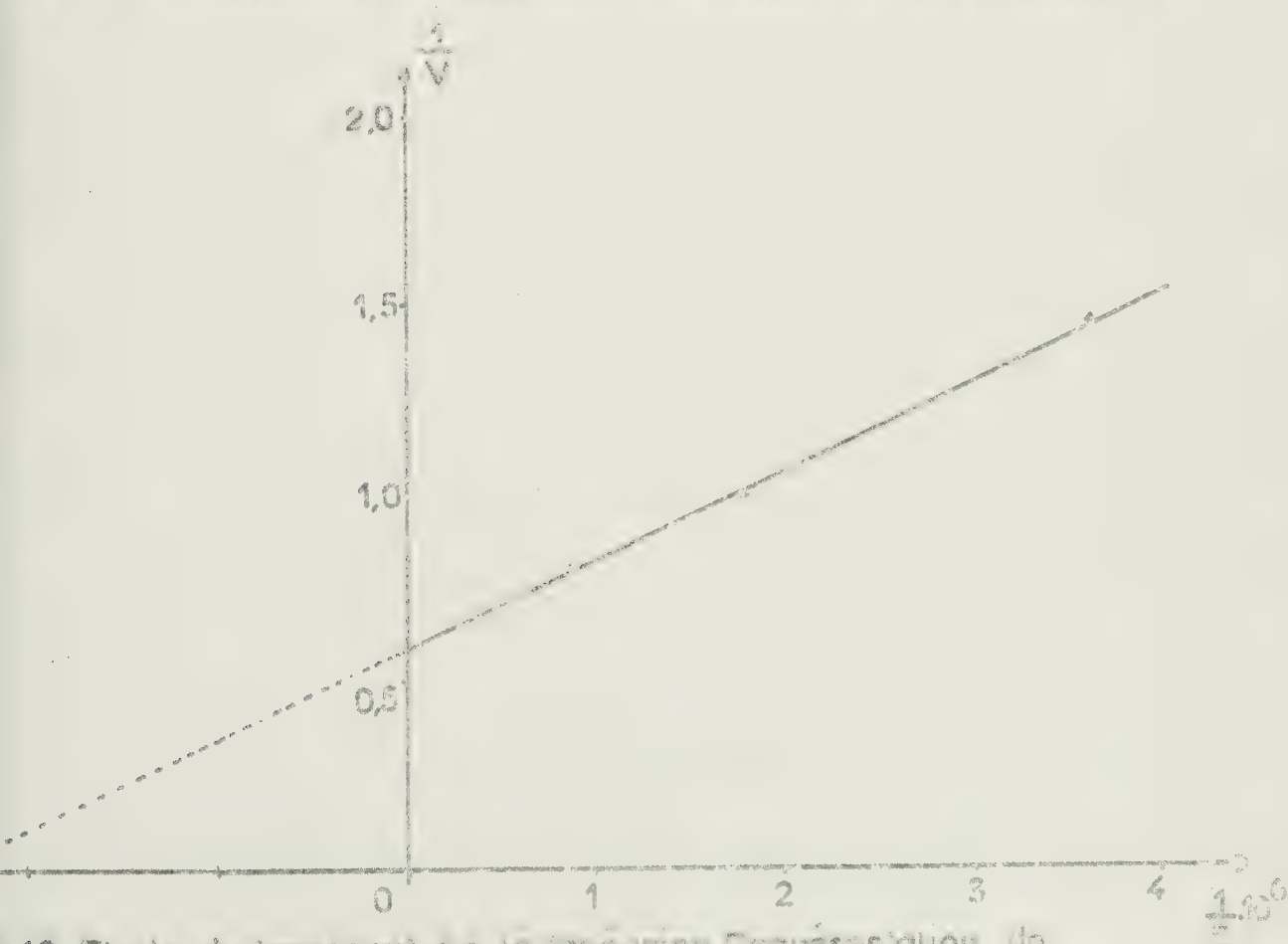


Fig.18. Etude du transport de la thréonine. Représentation de LINEWEAVER-BURK

S en mg/l^{-1} de thréonine dans le milieu

V en μg de thréonine fixée par mg de myc. sec et par min.

n'influence pas la nature du transport, nous avons utilisé l'Actinomycine D, inhibiteur de la synthèse protéique. La courbe 6 de la figure 17 montre que, dans ces conditions, la vitesse initiale d'entrée ne diffère pas de la vitesse initiale obtenue en absence d'inhibiteur. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié le processus de transport de la thréonine sans inhibiteur.

Les courbes de la figure 17 présentent une allure hyperbolique ; de plus si on porte sur une seconde figure (Fig. 18) en abscisse l'inverse de la quantité de thréonine contenue dans le milieu et en ordonnée l'inverse de la vitesse initiale de pénétration de la thréonine, on obtient une droite.

Ceci nous amène donc à penser à un transport soit par diffusion facilitée, soit par transport actif.

Pour pouvoir conclure, nous avons reproduit l'expérience en présence de 2,4 dinitrophénol, inhibiteur de la phosphorylation oxydative. On sait en effet que le transport par diffusion facilitée contrairement au transport actif, n'est pas sensible aux inhibiteurs du métabolisme énergétique.

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 17 (courbe 4 et 5). On y observe une inhibition à 50% du processus de transport.

Ces résultats nous montrent que le transport de la thréonine libre présente tous les caractères d'un transport actif dont les constantes cinétiques sont $V_m = 1,78 \mu\text{g}$ de thréonine fixée par mg de mycélium sec et par minute et $K_m = 42 \times 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$.

Nous apportons cependant une restriction à cette conclusion, en effet, pour décider d'un transport actif il serait nécessaire de connaître la concentration interne et non pas seulement le teneur en thréonine rapportée au poids sec de mycélium.

II-2-2 Pénétration du cuivre, sous forme de complexe dans le milieu.

Comme dans le cas des ions Cu^{++} libres, il s'agit de déterminer

la cinétique de pénétration du complexe thréonine-cuivre.

Les concentrations en complexe étant exprimées en mg de cuivre par litre, nous avons travaillé avec 4 concentrations différentes comprises entre 50 et 300 mg Cu.l⁻¹.

Ces teneurs en Cu sont identiques aux concentrations en Cu libre déjà utilisées, ce qui doit faciliter les comparaisons.

Les résultats de ces expériences sont présentés figure 19.

Les courbes obtenues sont tout à fait remarquables; ainsi à partir de 150 mg Cu.l⁻¹, on note nettement deux étapes successives :

- La première correspond à une pénétration très rapide du cuivre (de l'ordre de 2 minutes). De plus la quantité maximale de cuivre fixée sur le mycélium est sensiblement proportionnelle à la concentration en complexe dans le milieu extérieur.

- La seconde, au contraire, met en évidence une "perte" de cuivre par le mycélium vers le milieu extérieur.

Cette sortie du cuivre se fait suivant une phase exponentielle comme en témoigne le tracé en coordonnées semi-logarithmiques de la courbe n°2. On remarque de plus que, dans tous les cas, la vitesse de sortie du cuivre tend vers une valeur limite identique de l'ordre 25x10⁻⁴ µg de Cu par mg de mycélium sec et par minute.

Si on compare les quantités de cuivre fixées à celles obtenues au cours des expériences effectuées en présence de cuivre ionique, on remarque, qu'en deux minutes, il entre en moyenne 35 fois plus de cuivre dans le mycélium ; cette proportion tombe à 2 fois au bout de deux heures de "contact" entre le mycélium et le complexe (Fig. 20).

L'interprétation de ce phénomène n'est pas simple. On peut toutefois envisager l'existence dans la structure mycélienne d'au moins 2 compartiments (Fig. 21).

Un compartiment A qui se sature très rapidement et dont les sites de fixation pour le cuivre sont en nombre constant.

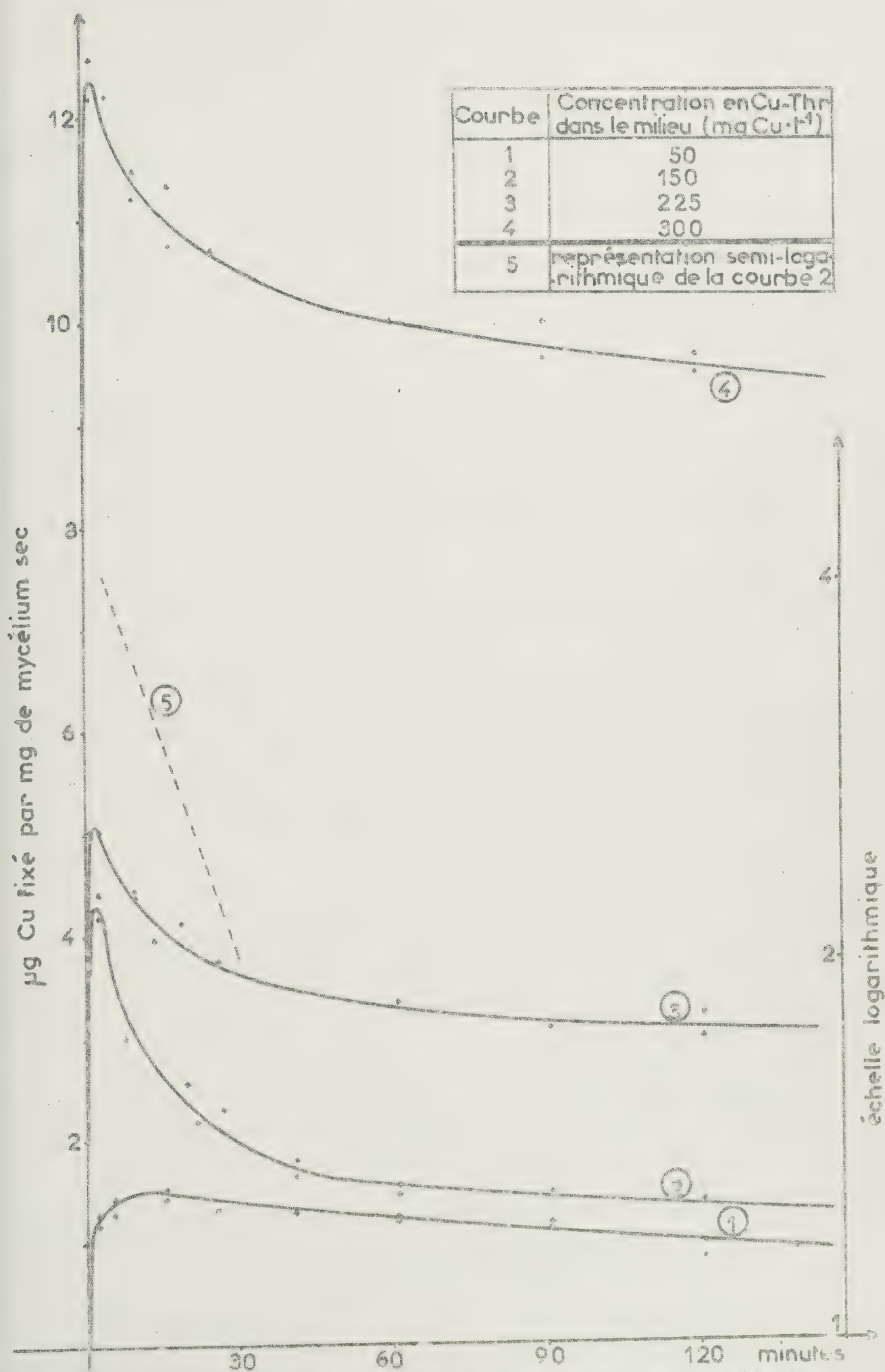


Fig. 19. Absorption du cuivre (sous forme de complexe dans le milieu) dans le mycélium d'*A. niger*.

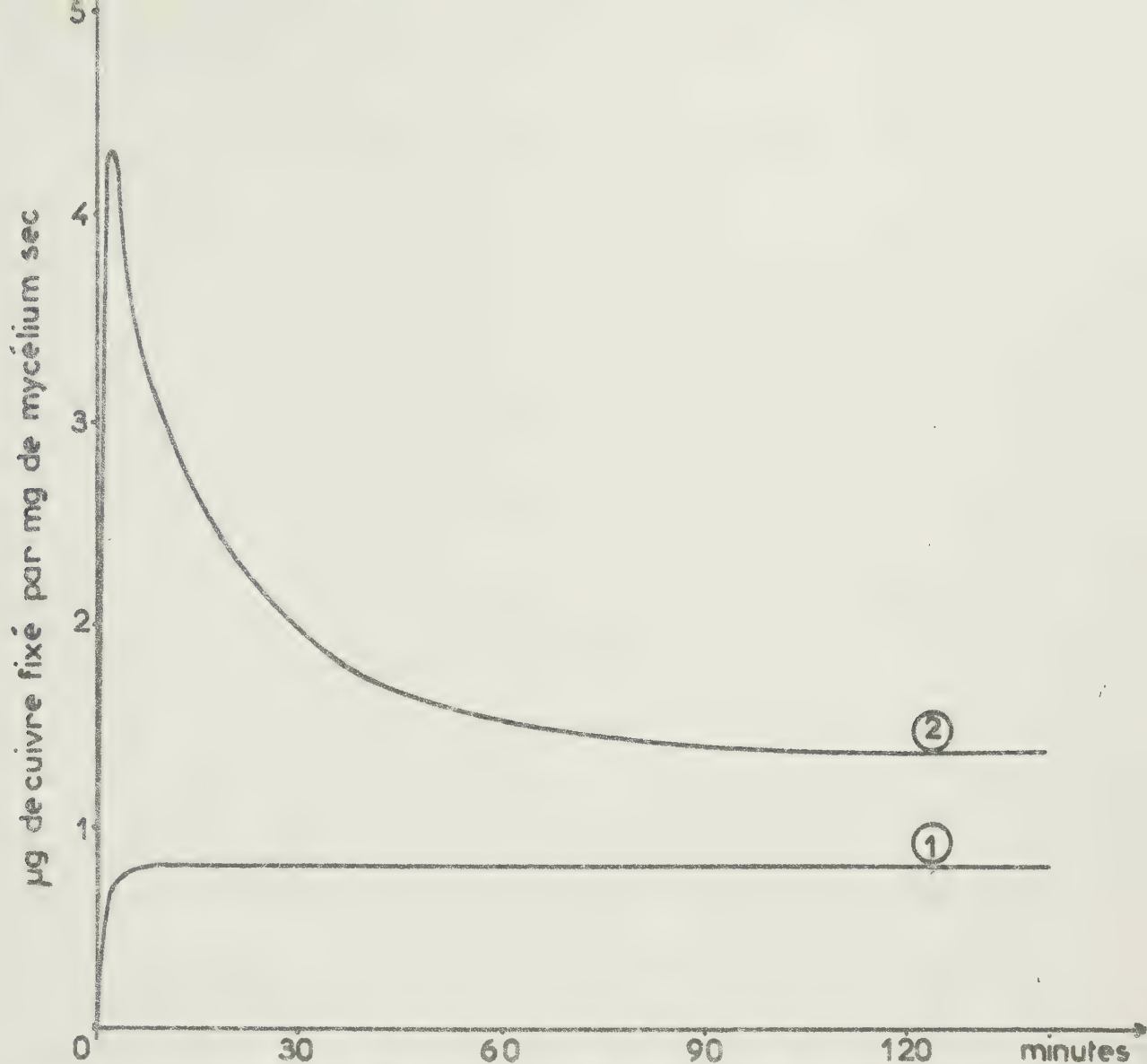


Fig. 20 - Comparaison de la fixation du cuivre ionique ① et du cuivre complexé ② ($150\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)

Conc.int. en Cu-Thr dans le milieu ext.	50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	150	300
Répartition du cuivre (•) dans la cellule			

Fig 21 - Essai d'interprétation de la fixation du cuivre complexé par le mycélium d'A.niger

Un compartiment B qui accumule le cuivre après saturation du compartiment A et dont le nombre de sites disponibles est une fonction de la concentration^C en cuivre dans le milieu extérieur.

Après le processus d'accumulation, la perte du cuivre semble caractériser un effet d'exclusion dû, sans doute, à une modification des sites de fixation du cuivre dans le compartiment B.

II-2-3 -- Pénétration de la thréonine sous forme de complexe thréonine-cuivre.

Il était d'autre part intéressant de rechercher la nature du processus de pénétration de la thréonine sous forme de thréonine-cuivre dans le mycélium. Pour cela nous avons préparé le complexe marqué ¹⁴C-thréonine-cuivre. L'expérience se déroule dans les mêmes conditions que pour l'étude de la pénétration du cuivre.

La figure 22 donne la quantité de thréonine fixée en fonction du temps (courbe 1: thréonine libre, courbe 2 : thréonine complexée).

On remarque une diminution très importante de la vitesse de pénétration de la thréonine ainsi que de la quantité d'acide aminé accumulé à l'équilibre. De plus, la courbe obtenue présente un point de rebroussement caractéristique. Sa manifestation au cours des différentes expériences est la confirmation de l'existence du phénomène.

Ce point de rebroussement coïncide avec un brusque accroissement de la vitesse de transport de la thréonine. Parallèlement on observe une correspondance entre cet accroissement et le retour à l'équilibre de la teneur en cuivre du mycélium. Tout se passe donc comme si, au cours de la pénétration rapide du cuivre et de son accumulation transitoire dans les quelques minutes qui suivent son introduction dans le milieu (Fig. 20), le cuivre freinait le processus de pénétration de la thréonine dans le mycélium. Le retour de la teneur en cuivre à sa valeur d'équilibre entraîne une levée de l'inhibition temporaire et l'accroissement de la vitesse de transport de la thréonine.

Au bout de 2 minutes (Fig 20-22) l'analyse montre que la quantité

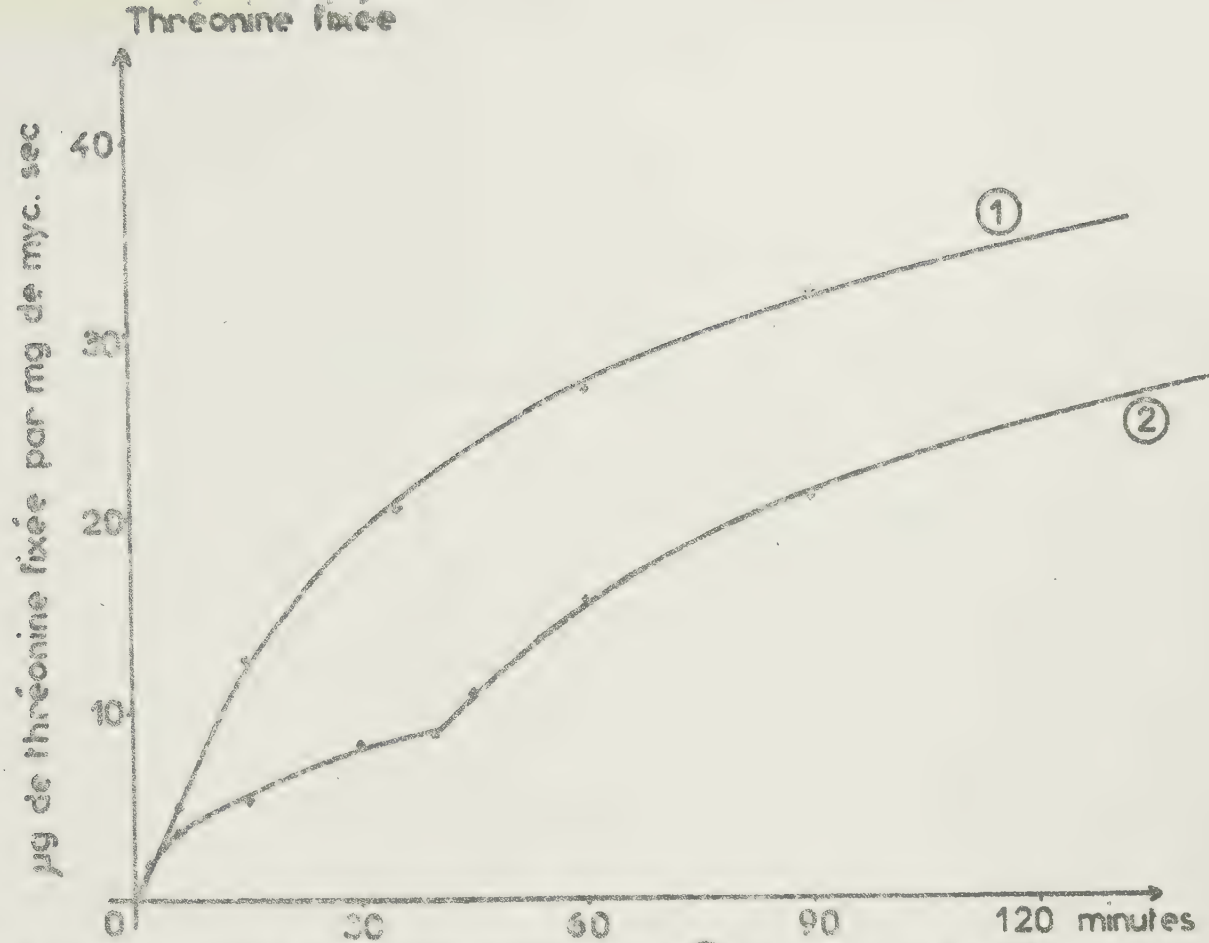


Fig. 22. Fixation de la thréonine libre ① et complexée ②
concentration : $547,5 \text{ mg.l}^{-1}$

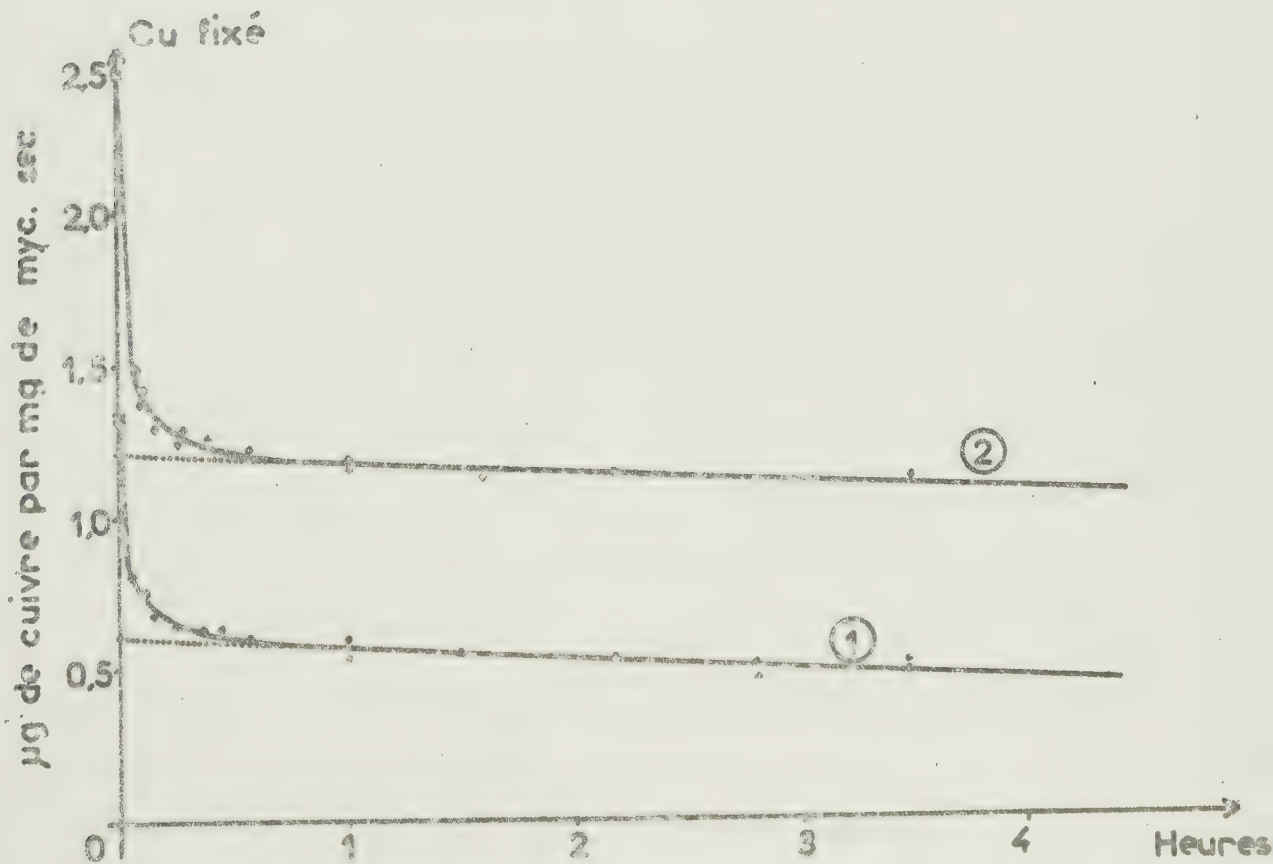


Fig. 24. Exsorption du cuivre, préalablement fixé par *A. niger* dans
le milieu de Watson contenant pour ① 250 mg Cu.l^{-1}
-pour ② 500 mg Cu.l^{-1}

de cuivre qui a pénétré dans le mycélium ($6,6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) est, approximativement compte tenu de l'imprécision dans l'estimation de la thréonine, 4 fois plus grande que la quantité de thréonine ($1,6 \times 10^{-2} \mu\text{M}$). Ce résultat est d'autant plus inattendu que la composition stoechiométrique du complexe thréonine-cuivre utilisé laissait prévoir une accumulation en cuivre égale à la moitié de la thréonine entraînée. Il est donc pratiquement acquis que le complexe Thr-Cu-Thr ne pénètre pas sans transformation préalable dans le mycélium ; cependant la présence de la thréonine à côté du cuivre a pour effet , comme nous venons de le voir, de faciliter la pénétration de ce dernier. Par contre, le cuivre entraîne l'inhibition partielle du processus de pénétration de la thréonine dans le mycélium d'*A.niger*. Ce comportement tend à confirmer l'existence d'un processus de contre-transport lorsque thréonine et cuivre sont introduits ensemble dans le milieu d'expérience.

II-2-4 - Influence du rapport Cu/Thr sur la pénétration du cuivre

Afin de préciser la nature de la relation qui s'établit entre la forme et l'amplitude de la courbe de pénétration du cuivre dans le mycélium en présence de thréonine, nous avons fait varier le rapport Cu/Thr en maintenant la concentration en cuivre constante (150 mg.l^{-1}). Les résultats de ces expériences sont exprimés par les courbes de la figure 23. Pour des valeurs décroissantes du rapport Cu/Thr (voir tableau de la Fig. 23) on assiste progressivement (courbes 1,2,3 et 4) à une disparition de la phase rapide de pénétration du cuivre et à une diminution parallèle de la quantité maximale du cuivre fixé dans le mycélium. Par contre, à l'exception de la courbe 1 dont le retour à l'équilibre est plus long, les quantités de cuivre tendent vers une même valeur de l'ordre de $1,3 \mu\text{g de Cu.mg}^{-1}$ de mycélium sec , au bout de 60 minutes environ.

Ces résultats montrent d'une part que la thréonine est indispen-

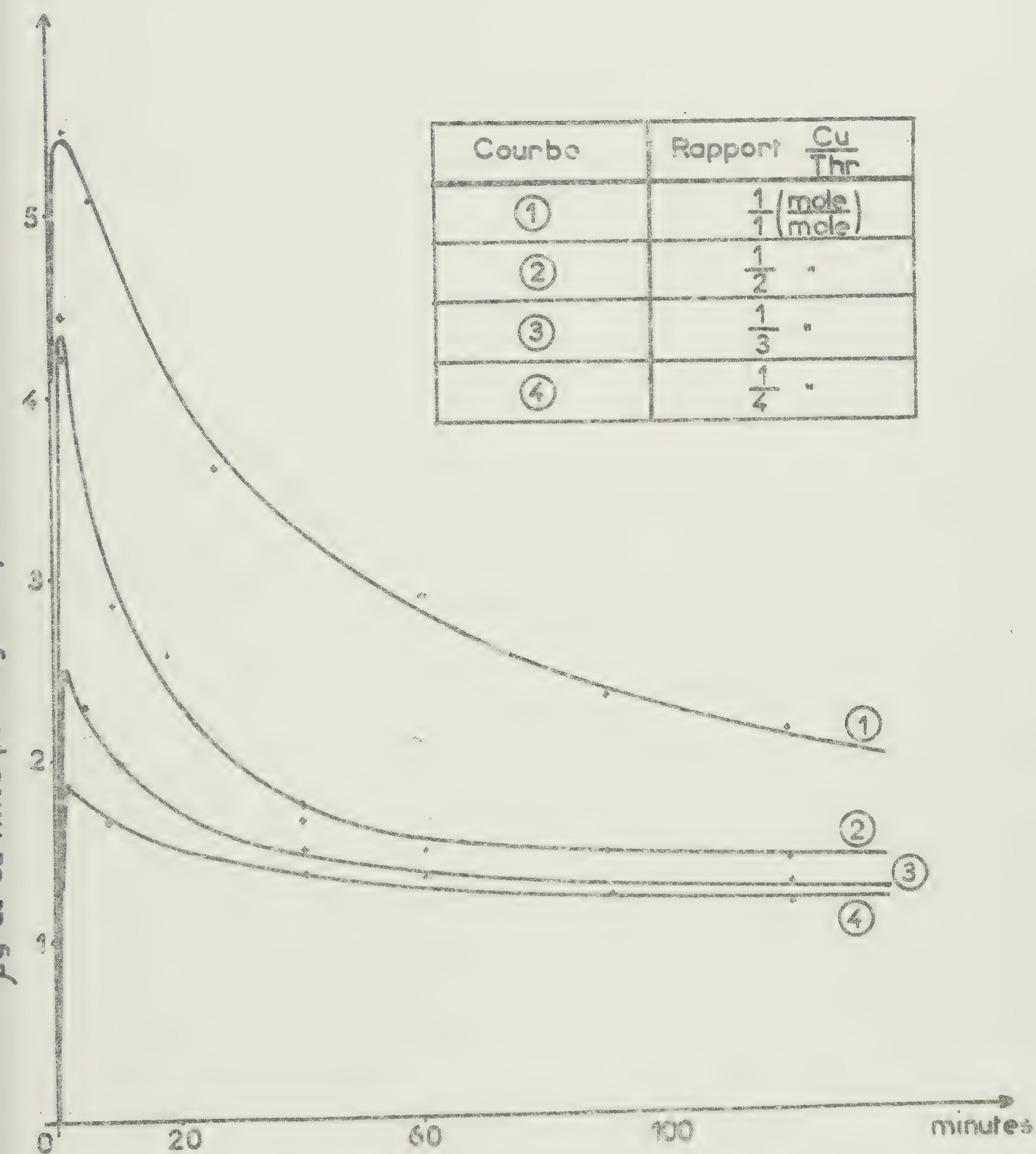


Fig. 23 - influence des quantités respectives de Cu et de Thr dans le milieu .

--sable pour que se manifeste ce processus de pénétration du cuivre, d'autre part que plus le rapport Cu/Thr est élevé plus la phase rapide provoque une accumulation transitoire de cuivre importante.

Cet ensemble de résultats tend à confirmer l'existence d'un contre-transport du cuivre en présence de thréonine au cours de la pénétration de cet élément dans le mycélium d'A.niger.

II-3 -- Exsorption du cuivre

II-3-1 -- Cas où le mycélium est chargé en Cu au contact d'une solution ionique de cet élément.

Nous avons opéré suivant le processus décrit dans "Matériel et Méthodes" chapitre XIII-2 .

Le mycélium, une fois "chargé" en cuivre a été remis en suspension dans un des milieux suivants :

- Milieu de Watson (glucose 10 g.l⁻¹, sans cuivre)
- Eau distillée
- Solution de glucose 10 g.l⁻¹
- Solution de thréonine 547,5 mg.l⁻¹
- Solution de glucose 10 g.l⁻¹ + quantités variables de
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Dans un premier temps nous avons "chargé" du mycélium avec différentes quantités de cuivre sous forme de sulfate, le milieu d'exsorption étant le milieu de Watson. Nous avons observé la sortie du cuivre au cours du temps (Fig.24 : teneur du milieu de charge courbe 1 : 250 mg.l⁻¹ et courbe 2 : 500 mg.l⁻¹).

Les courbes présentent deux parties :

-- Une étape courte (moins de 10 minutes) et à caractère exponentiel, au cours de laquelle le cuivre est exsorbé très rapidement dans le milieu ambiant. Au cours de cette étape les vitesses initiales d'exsorption du cuivre sont sensiblement proportionnelles à la teneur initiale du mycélium en cuivre.

- Une deuxième étape, très lente, qui se manifeste par une faible exsorption proportionnelle au temps. Durant cette période la vitesse d'exsorption est constante et donc indépendante de la teneur en cuivre du mycélium.

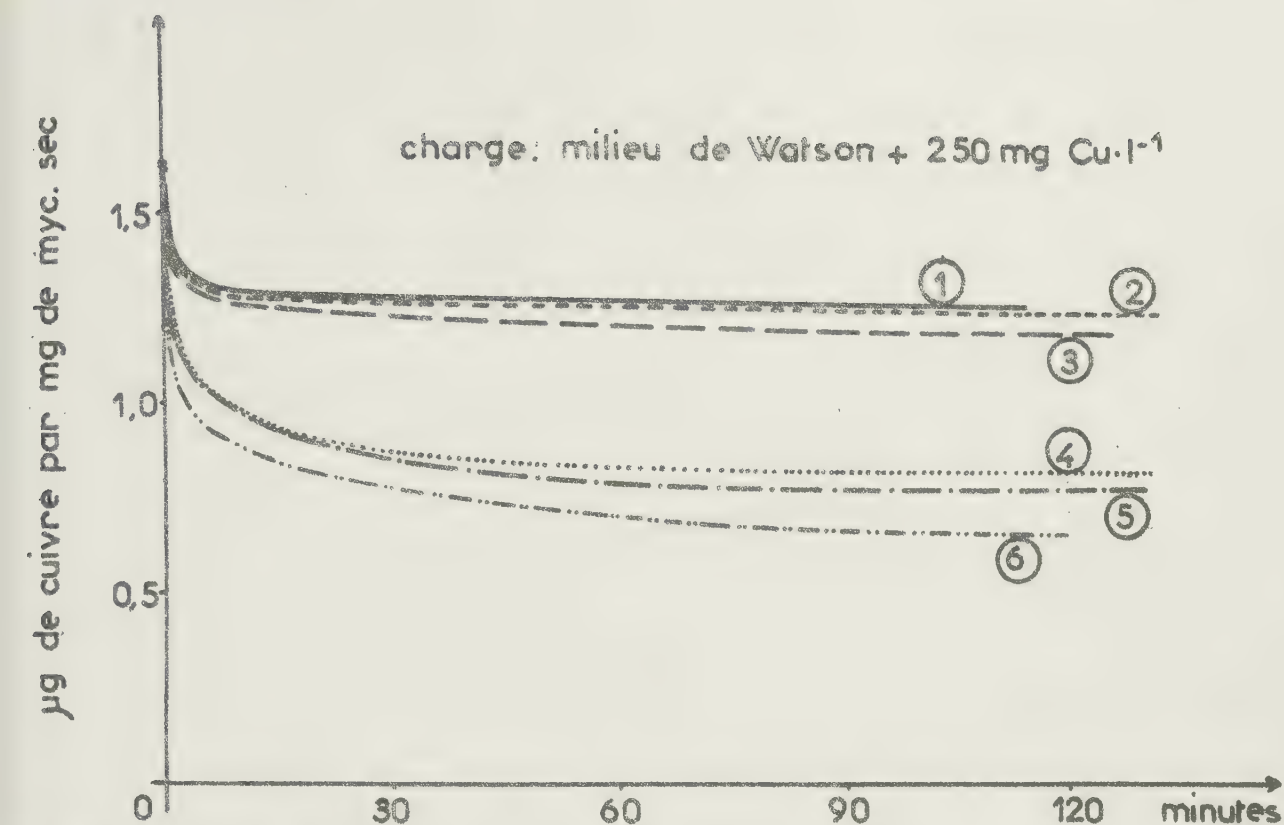
Ces deux étapes nous permettent de supposer l'existence d'au moins deux compartiments différents "mis à la disposition" du cuivre dans le mycélium. Ces deux compartiments contiennent des quantités variables de cuivre : ainsi en prolongeant (Fig. 24) la partie linéaire des courbes d'exsorption (2^e étape) le point de rencontre avec l'axe des ordonnées permet de déterminer la concentration en cuivre contenue initialement dans le compartiment concerné. On peut remarquer que cette teneur représente sensiblement la moitié de la teneur initiale en cuivre fixé par le mycélium.

On pourrait donc penser à une répartition initiale équivalente du cuivre de part et d'autre de la membrane, de telle sorte qu'il existe un équilibre électrochimique assurant la neutralité électrique de l'ensemble.

Le cuivre fixé à la surface externe de la membrane sur des sites anioniques pourrait être facilement échangé par des cations divalents dont le milieu est riche. Par contre, en ce qui concerne le cuivre réparti sur la surface interne, la nature des sites de fixation n'est certainement pas la même, ce qui explique les différences des vitesses d'exsorption.

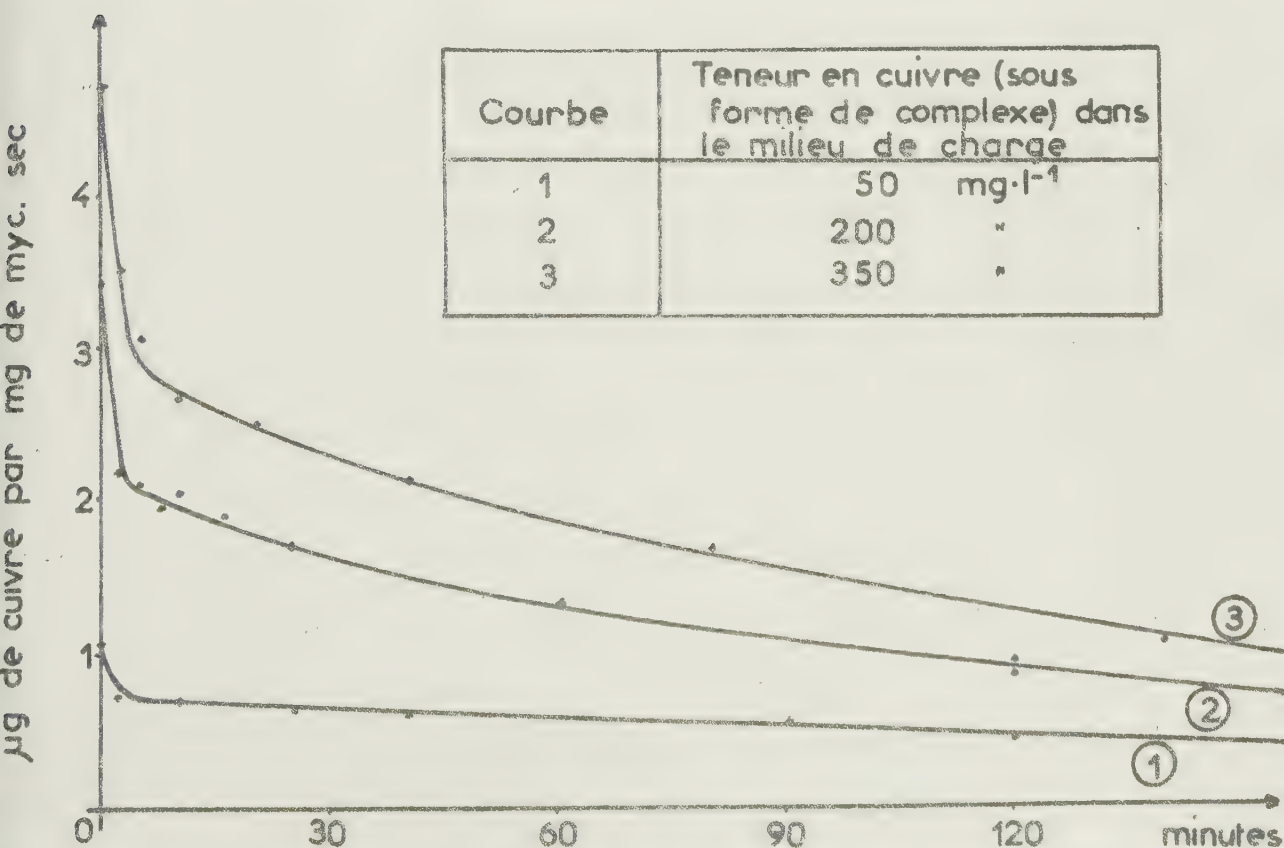
Il était donc intéressant de vérifier ces résultats en modifiant le milieu d'exsorption.

La figure 25 montre les résultats obtenus avec des milieux non ioniques ou avec des milieux modifiés. Ainsi en absence d'ions dans le milieu de décharge, la perte de cuivre est toujours de l'ordre de 20%, que le milieu de décharge soit de l'eau distillée (courbe 1), une solution de glucose 10g.l^{-1} (courbe 2) ou même une solution de thréonine dans l'eau distillée (courbe 3).



g 25. Exsorption du cuivre dans différents milieux:

- | | |
|---|---|
| ① Eau distillée | ④ Solution de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,271g.l ⁻¹ |
| ② Solution de glucose 10g.l ⁻¹ | ⑤ - id - 2,542g.l ⁻¹ |
| ③ Solution de thréonine 547,5mg.l ⁻¹ | ⑥ - id - 3,814g.l ⁻¹ |



g. 26. Exsorption du cuivre chargé sous forme de complexe Cu-Thr

(Dans ce dernier cas on aurait en effet pu penser que des phénomènes de complexation entre le cuivre et la thréonine modifieraient le processus).

En revanche, après avoir calculé la force ionique du milieu de Watson, nous avons reconstitué un milieu de même force ionique (ou de force ionique sous-multiple) ne contenant que du sulfate de magnésium.

Rappelons ici l'expression de la force ionique d'une solution saline:

$$\frac{F}{2} = \frac{\sum mZ^2}{2} \quad \text{ou } m = \text{concentration molaire de l'ion}$$

et Z = charge de cet ion.

Pour le milieu de Watson on obtient $\frac{F}{2} = 61,95 \times 10^{-3}$
ce qui nous conduit à une concentration en $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ $X = 3,814 \text{ g.l}^{-1}$

Dans ce cas (courbe 4 - 5 et 6 de la figure 25) on observe une perte de cuivre par le mycélium qui atteint cette fois des valeurs plus importantes (de l'ordre de 40% pour une concentration en sulfate de magnésium de $\frac{X}{4}$ à 50% pour une solution de force ionique égale à celle du milieu de Watson (soit une concentration de X)). Cette valeur de 50% correspond exactement à la valeur obtenue avec le milieu de Watson.

D'autre part on remarque que dans tous les cas les courbes présentent les 2 étapes déjà rencontrées plus haut mais que dans le cas d'un milieu non ionique la première étape est plus courte. De plus au cours de la seconde, la vitesse d'exsorption tend vers zéro. Par contre dans le cas de l'utilisation de sulfate de magnésium les courbes sont très voisines de celles obtenues avec le milieu de Watson.

Ces expériences permettent donc de confirmer qu'il s'établit un processus d'échange d'ions et que ce phénomène se manifeste surtout au cours de la première étape; mais on ne peut pas dire pour autant

qu'il est absent de la seconde.

Par contre une partie non négligeable du cuivre est perdue par simple diffusion lors de l'utilisation d'un milieu non ionique (environ 20%).

II-3-2 - Cas où le mycélium est chargé en Cu au contact d'une solution complexée de cet élément.

Parallèlement aux expériences menées avec du cuivre ionique, nous avons dispersé des quantités égales de mycélium dans le milieu de Watson contenant 50, 200 et 350 mg.l⁻¹ de cuivre sous forme de complexe thréonine-cuivre. Nous avons ensuite opéré de la même manière que précédemment.

Sur la figure 26 nous avons reporté les 3 courbes obtenues. Ces graphes, comme les précédents, font apparaître l'existence de deux compartiments nettement distincts l'un de l'autre, mis en évidence par les deux étapes de ces courbes.

Au cours de la première étape de faible durée (moins de 10 minutes), 25 à 50% du cuivre fixé sort du mycélium. Par contre lors de la deuxième étape, la sortie du cuivre ne semble plus répondre à une cinétique d'ordre zéro, car la vitesse d'exsorption semble dépendre de la teneur en cuivre fixé initialement.

L'étude cinétique de la fixation du cuivre par le mycélium d'A.niger nous a donc permis d'émettre l'hypothèse que le cuivre se répartissait en une double couche de part et d'autre de la membrane.

La présence de thréonine dans le milieu favorise nettement l'entrée du cuivre.

Nous avons donc été amenés à penser, tout d'abord, à une simple diffusion ; cependant, l'étude de l'exsorption au cours de laquelle tout le cuivre fixé n'est pas libéré, semble indiquer plutôt une diffusion facilitée. Notons cependant que pour préciser la nature du mécanisme il serait souhaitable de procéder à la détermination plus

précise de l'espace libre cellulaire.

L'entrée du cuivre dans la cellule ayant été confirmée, il était intéressant de rechercher son intervention au niveau du métabolisme cellulaire, c'est ce que nous nous sommes attachés à montrer dans le chapitre suivant.

III - Etude des relations existant entre le transport du cuivre et l'activité métabolique du mycélium.

Il s'agit en fait de mettre en évidence l'influence du cuivre sur le comportement métabolique du mycélium, de façon à confirmer les résultats obtenus au cours des expériences de pénétration. On peut penser en effet que l'action du cuivre en tant qu'effecteur sur un système enzymatique donné constitue la meilleure preuve de sa pénétration et de sa fixation au niveau d'un organe donné.

III-1 - Etude respirométrique.

Nous avons d'abord étudié le comportement respirométrique du mycélium car les échanges respiratoires représentent le processus métabolique le plus facilement accessible.

La mesure du gaz carbonique dégagé au cours du temps, ainsi que le calcul du quotient respiratoire (Q.R.), permettent de déterminer l'importance des échanges gazeux. Rappelons que le quotient respiratoire exprime le rapport de la quantité de CO_2 dégagé à la quantité d'oxygène absorbé, pour une même quantité de microorganisme et pendant le même temps.

Le principe de ces expériences a été rappelé dans le chapitre "Matériel et Méthodes".

III-1-1 - Influence du cuivre sur la respiration du mycélium.

III-1-1-a - Influence de la concentration en cuivre dans le milieu.

Il apparaît nettement (Fig. 27) que l'addition de cuivre une heure après le début de l'expérience provoque une augmentation du dégagement

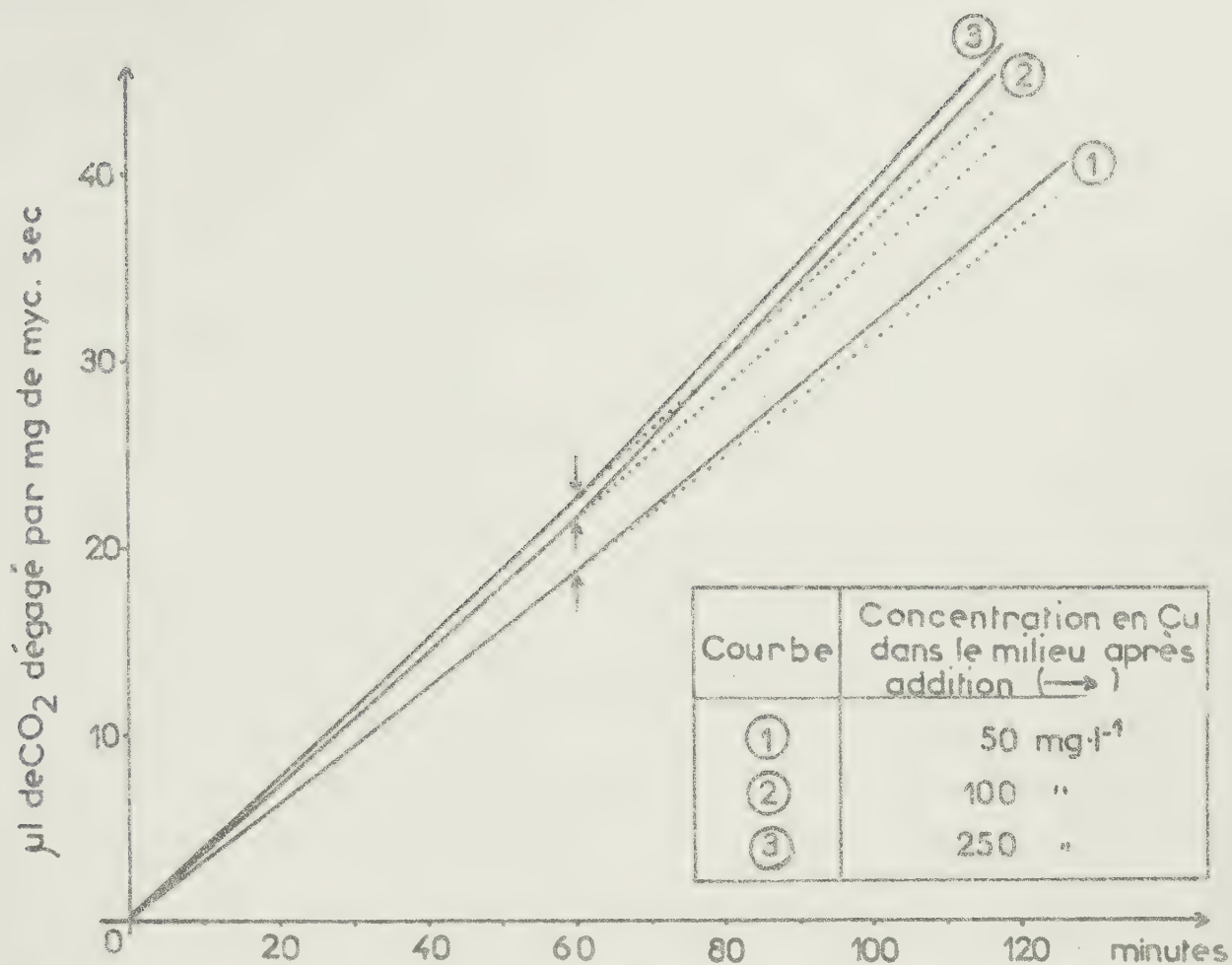


Fig. 27 - Influence de la concentration en Cu sur le dégagement de CO₂

	Vitesse de respiration µl de CO ₂ dégagé/mg myc sec/h.					Quotient respiratoire			
	teneur en cuivre mg·l ⁻¹				Δ	teneur en cuivre mg·l ⁻¹			
	0	50	100	250		0	50	100	250
Milieu de Watson	19,2	20,2			+ 1	1,1	1,1		
	22		24,8		+2,8	1		1	
	19,5		25,1		+5,6	1		1	
	21,7			24,5	+2,8	1			1
Milieu sans glucose	8,6			15,8	+7,6	1,1			1,1
	15,5			12,8	-2,7	0,8			0,8
Milieu à l'α-céto-glutarate	12,3			9	-3,3	0,75			0,75
	6,6			10,2	+3,6	0,95			1

Tableau N° 4
Comportement respiratoire du mycélium

de gaz carbonique. On remarque de plus que cet accroissement augmente avec la teneur en cuivre du milieu. Les courbes 2 et 3 montrent que cet accroissement tend vers un maximum quand les concentrations en cuivre augmentent.

De plus, il faut noter que cet accroissement n'est vraiment sensible qu'à partir de 50 mg de cuivre par litre dans le milieu.

Le fait que le quotient respiratoire reste voisin de 1 (cf Tableau n°4, p.74) montre qu'il s'agit vraisemblablement d'une accélération de la vitesse de respiration et non pas d'une augmentation de phénomènes d'oxydation, dont le cuivre serait le catalyseur. Dans ce cas, la consommation en oxygène augmenterait, le rejet du CO_2 resterait stationnaire, diminuant le Q.R., ce qui n'est pas le cas ici.

III-1-1-b - Influence de "l'état respiratoire" du mycélium d'A.niger

Selon les cultures et surtout suivant le moment où est fait le prélèvement du mycélium, nous avons remarqué que ce dernier ne se présentait pas toujours dans le même état respiratoire. Cela signifie que, suivant les cas, le dégagement de CO_2 est plus ou moins intense, le Q.R. restant toujours très voisin de 1. Il nous a paru intéressant de suivre le comportement respiratoire en présence de cuivre dans les différents cas.

Nous avons effectué des essais avec des concentrations en cuivre de 100 mg.l^{-1} et 250 mg.l^{-1} pour lesquelles les vitesses de respiration étaient respectivement, avant addition de cuivre :

22 et $19,5 \mu\text{l}$ de CO_2 par heure et par mg de mycélium sec pour la 1^{ère}

21,7 et $8,6 \mu\text{l}$ de CO_2 par heure et par mg de mycélium sec pour la 2^{ème}.

La figure 28 montre que plus la vitesse initiale de respiration est faible, plus l'accroissement de cette vitesse est important. Ceci traduit certainement une modification au niveau du processus respiratoire.

On remarquera de plus que quel que soit la concentration en cuivre

la vitesse de respiration tend vers la même valeur de $25 \mu\text{l de CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ de mycélium sec. h^{-1} quand la vitesse initiale de respiration est voisine de $20 \mu\text{l de CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ de mycélium sec. h^{-1} .

En fait, tout se passe comme si l'addition d'une quantité de cuivre supérieure à 50 mg.l^{-1} dans le milieu réactionnel faisait parvenir le mycélium à son niveau d'activité métabolique maximum. Ceci se vérifie quel que soit l'état respiratoire du mycélium.

III-1-1-c -- Effet de l'addition du cuivre à des instants différents.

Pour observer le phénomène plus facilement, nous avons jusqu'à présent ajouté le cuivre après une heure d'expérience.

Nous avons voulu savoir si l'addition de cuivre au temps zéro de l'expérience modifiait le phénomène observé. La figure 29 montre qu'il n'en est rien. Cette étude a été menée pour deux concentrations différentes en cuivre (Fig. 29-a: 100 mg.l^{-1} et b: 250 mg.l^{-1}).

Dans ces deux cas, on observe que l'accroissement de la vitesse de respiration est le même, qu'il s'agisse d'une addition au temps zéro ou au temps une heure; ceci se traduit sur la figure par le parallélisme des courbes après addition du cuivre.

L'augmentation de la vitesse de respiration est donc constante dans le temps, tout au moins pendant la durée de nos observations: deux heures.

En conclusion, l'influence du cuivre se traduit par un accroissement de la vitesse de respiration du mycélium, qui peut être dû à une augmentation de l'activité métabolique du champignon.

On peut encore penser à une action directe du cuivre, en tant que catalyseur de deshydrogénation, vis à vis d'un substrat qui subirait ensuite une décarboxylation. Dans ces conditions, le Q.R. demeurerait voisin de 1 comme dans le cas de la respiration sur glucose.

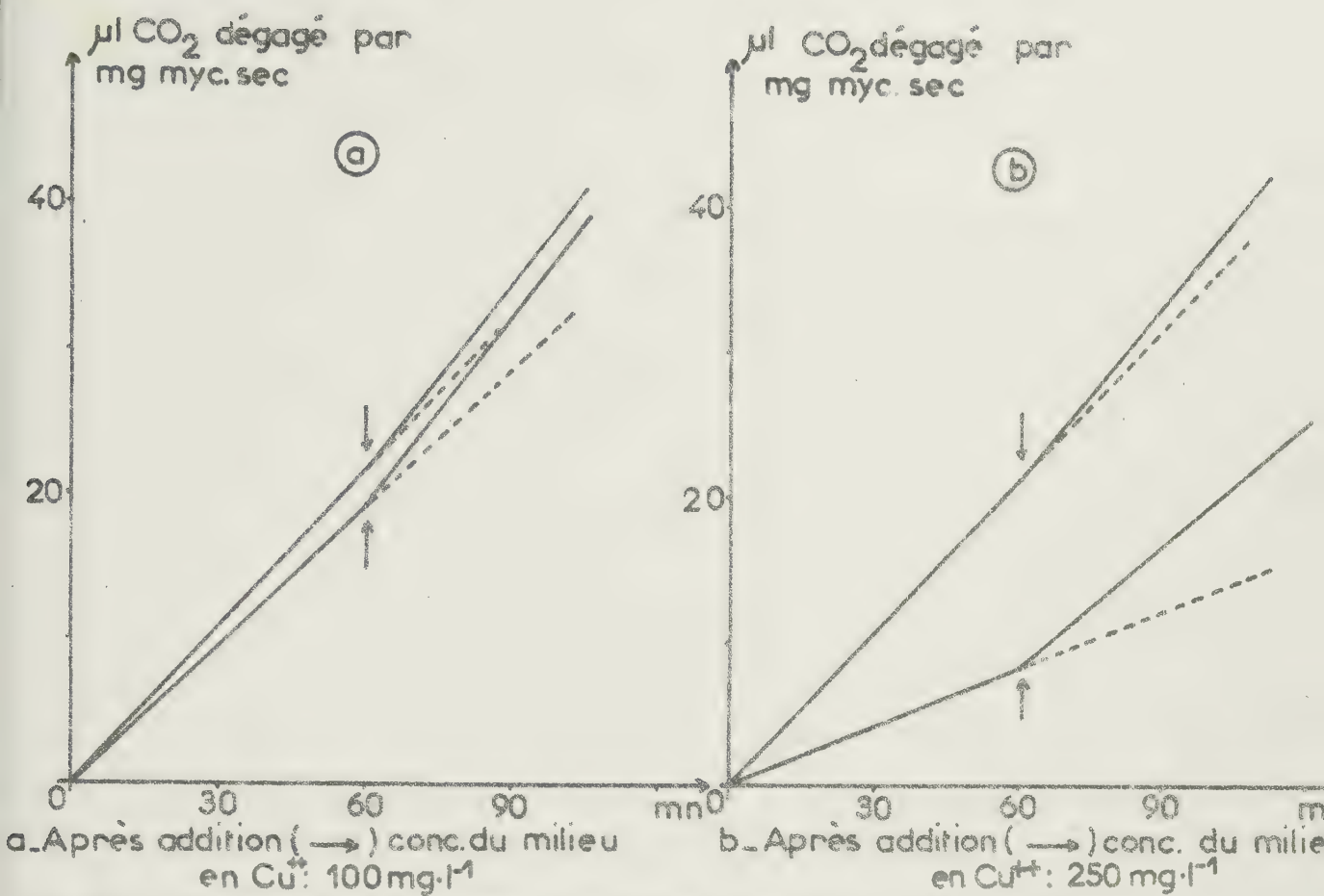


Fig.28 - Influence de l'état respiratoire du mycélium d'*A.niger*

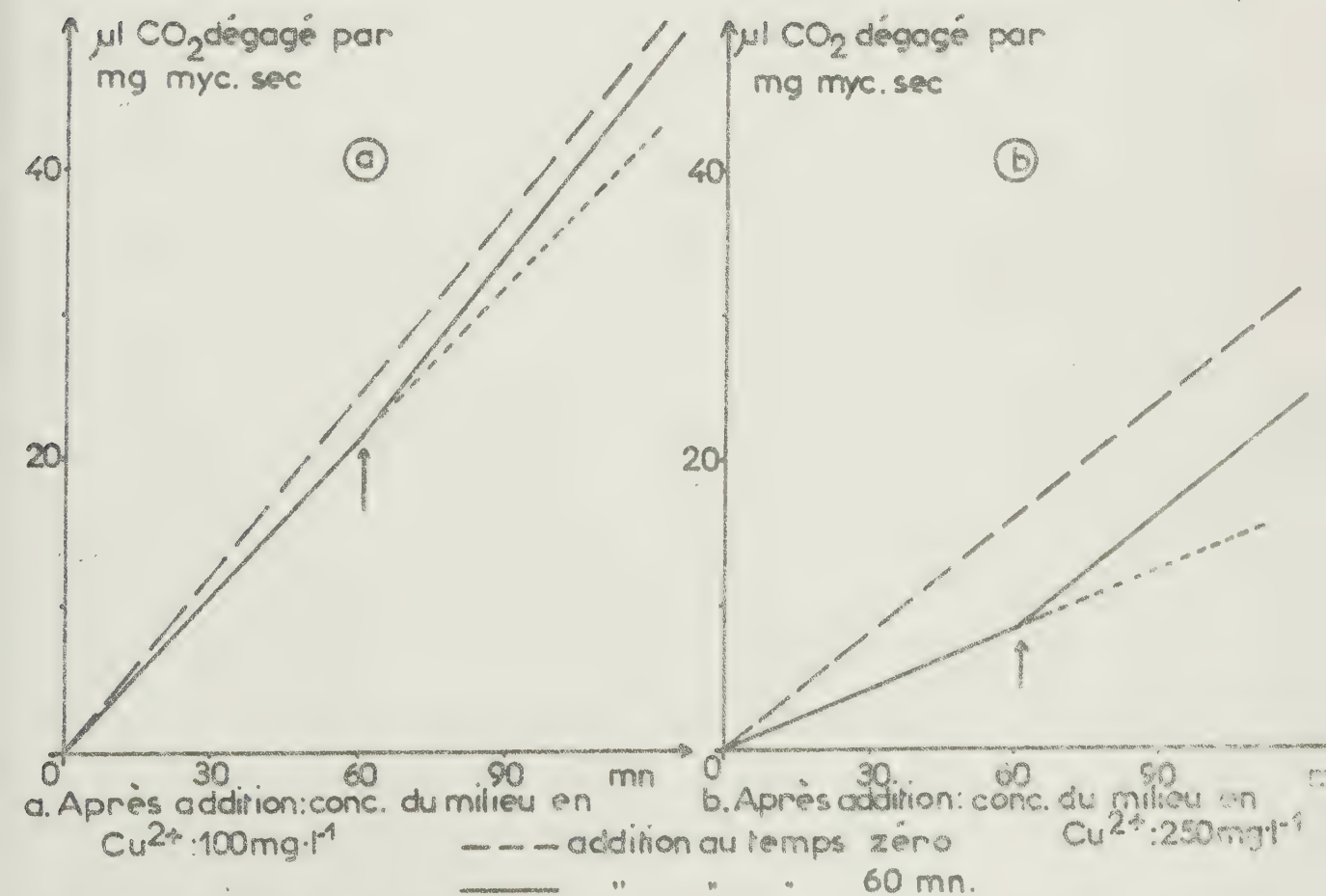


Fig.29 - Effet de l'addition du cuivre dans le milieu à des instants différents.

III-1-2 -- Influence du glucose sur la respiration d'A.niger. Effet du cuivre.

Un certain nombre d'expériences réalisées au cours de cette étude nous ont amené à penser que le glucose pouvait influencer l'activité du cuivre sur la respiration. C'est pourquoi nous avons comparé les vitesses de respiration du mycélium en présence et en absence de glucose, avec ou sans cuivre, dans le milieu réactionnel.

III-1-2-a -- Expériences en absence de cuivre.

La figure 30 permet d'illustrer les résultats obtenus. Dans les deux cas le processus est linéaire : la vitesse de respiration est constante. Par contre on remarque qu'en absence de glucose dans le milieu réactionnel la vitesse de respiration est beaucoup moins élevée ($15,5 \mu\text{l de CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de mycélium sec. h}^{-1}$) qu'en présence de 25 g de glucose par litre ($19,5 \mu\text{l de CO}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \text{ de mycélium sec. h}^{-1}$).

De plus on observe (Tableau n°4 -P. 74) qu'en absence de glucose le Q.R. tombe à 0,8 ce qui signifie qu'il y a peut-être dégradation des lipides de réserve du mycélium.

III-1-2-b -- Expériences en présence de cuivre.

On a vu, qu'en présence de glucose et de cuivre (pour une concentration supérieure à 50 mg.l^{-1}), la vitesse de respiration s'accroît nettement.

Au contraire, en absence de glucose, lorsque l'addition a lieu au début de l'expérience ou après 60 minutes, cet élément exerce un effet inhibiteur très significatif sur la respiration (Fig. 31).

Là encore, on observe des Q.R. de l'ordre de 0,8 ce qui dénote très certainement l'oxydation de certains constituants du mycélium autres que les composés glucidiques (lipides ?).

Cette série d'expériences nous permet de penser que le glucose joue un rôle protecteur très important vis à vis du mycélium.

Cependant si son rôle exact demeure encore inconnu il n'est pas

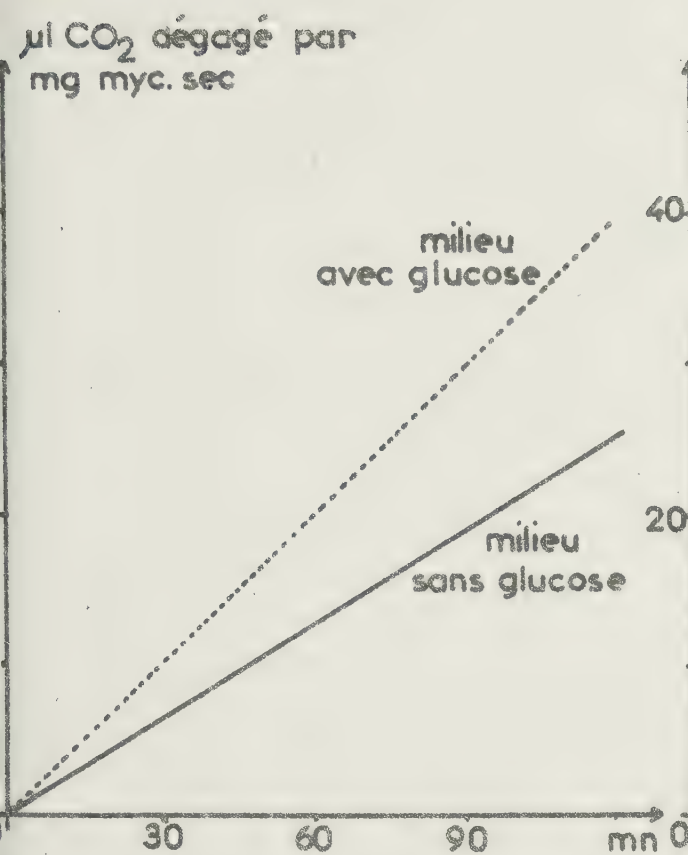


Fig.30. Influence du glucose, en absence de cuivre, sur la respiration du mycélium d'A.niger

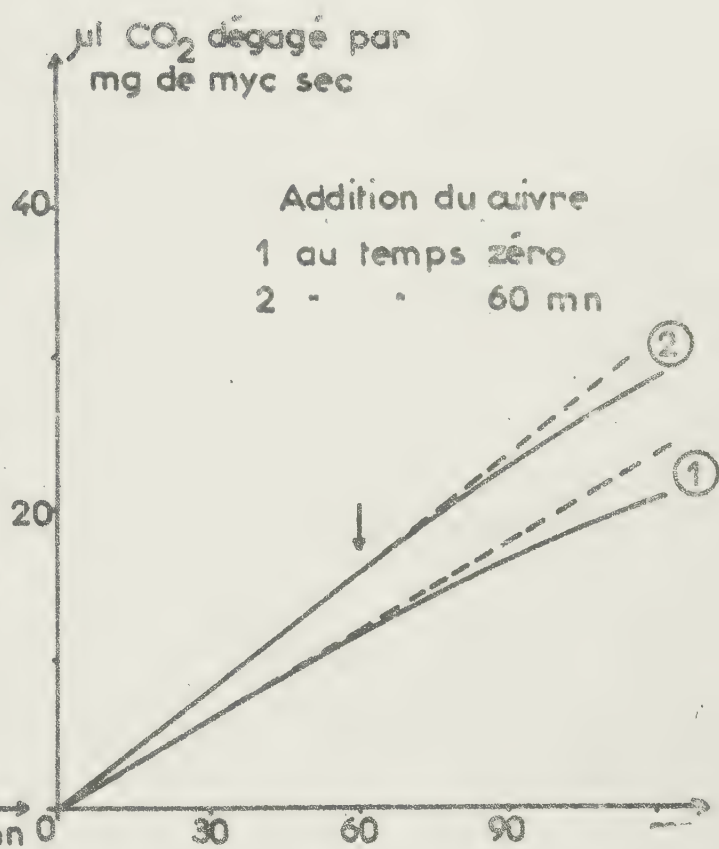
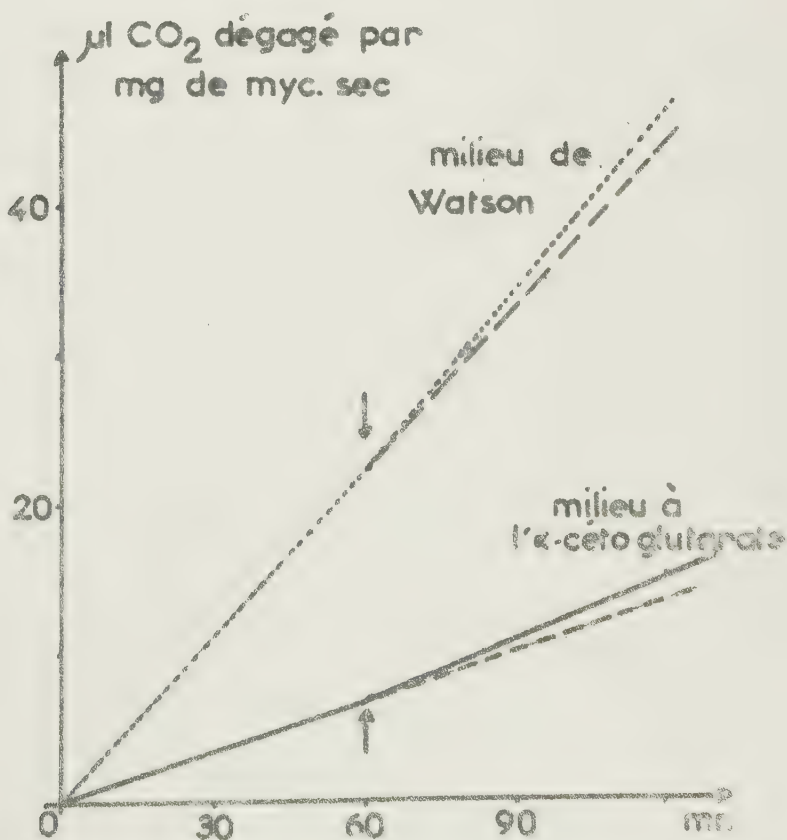


Fig.31. Effet du cuivre ($250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) en absence de glucose, sur la respiration du mycélium d'A.niger

Fig. 32. Influence de la nature du substrat carboné sur la respiration du mycélium d'A.niger.

→ addition de Cu^{2+} pour une concentration finale de $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$



invraisemblable de penser que le glucose s'oppose, tout au moins en partie, à l'entrée du cuivre dans le mycélium.

C'est d'ailleurs pour cette raison que toutes les études cinétiques que nous avons effectuées, ont été réalisées dans des milieux de composition bien définie, surtout en ce qui concerne leur teneur en glucose.

III-1-3 ~ Influence de la nature du substrat carboné sur la respiration du mycélium d'A.niger

Nous venons de voir l'importance que revêt le glucose dans l'action du cuivre sur la respiration. Il importe en fait de savoir si cette propriété est spécifique du glucose ou si d'autres substrats carbonés produisent les mêmes effets.

Nous avons donc remplacé le milieu de Watson (glucose 25 g.l^{-1} + nitrate d'ammonium +) par un milieu à l' α -céto-glutarate dont la composition est décrite au chapitre VI de "Matériel et Méthodes". Ce milieu a été mis au point pour l'étude des phénomènes respiratoires dans les mitochondries de levures (70).

Les résultats obtenus sont reportés figure 32. En absence ou en présence de 250 mg de Cu par litre, l'activité respiratoire présente les mêmes caractéristiques qu'avec un milieu contenant du glucose.

En définitive tout se passe comme si, en présence d'un substrat provenant de la dégradation du glucose, le cuivre exerçait une action favorable sur la respiration du mycélium.

III-1-4 - Etude de la respiration du mycélium à l'aide de l'Oxygraphe Gilson.

L'étude de la respiration à l'Oxygraphe Gilson, à l'aide d'une électrode de Clark, utilisée pour sa très grande précision, permet de confirmer les résultats obtenus au respiromètre.

Les différentes courbes de la figure 33 illustrent les résultats

La courbe a) met bien en évidence l'augmentation de la vitesse d'utilisation de l'oxygène après addition de cuivre dans le milieu.

Le complexe cuivre-thréonine (Fig. 33 b) provoque lui aussi l'augmentation de l'utilisation de l'oxygène et dans des proportions plus importantes.

On remarque en outre (Fig. 33 c), ainsi que nous l'avons noté précédemment (cf III-1-2), qu'en absence de glucose, la vitesse d'utilisation de l'oxygène est plus faible, mais qu'une addition de cuivre provoque une augmentation momentanée de celle-ci, suivie d'une inhibition.

Ces résultats confirment ceux que nous avons obtenus à l'aide de respiromètres, et nous permettent de penser à l'existence d'une liaison étroite entre le transport du cuivre et le métabolisme cellulaire.

III-1-5 - Etude de l'activité respiratoire des suspensions de mitochondries d'A.niger

Nous venons de voir quels rôles jouent le cuivre et le glucose vis à vis du mycélium entier; il serait à priori intéressant de contrôler leur action successive ou simultanée sur la respiration des mitochondries.

III-1-5-a - Etude de l'activité succino-deshydrogénasique des suspensions de mitochondries.

Cette méthode simple permet en effet de contrôler indirectement l'activité respiratoire d'une suspension de mitochondries.

Principe :

Au cours du cycle de Krebs, l'acide succinique est oxydé en acide fumarique en présence de FAD qui est transformé en FADH_2 . Les H arrachés sont transférés sur le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCI) pour donner le leucodérivé incolore. La manipulation consiste à suivre la décoloration de la solution de DCI.

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

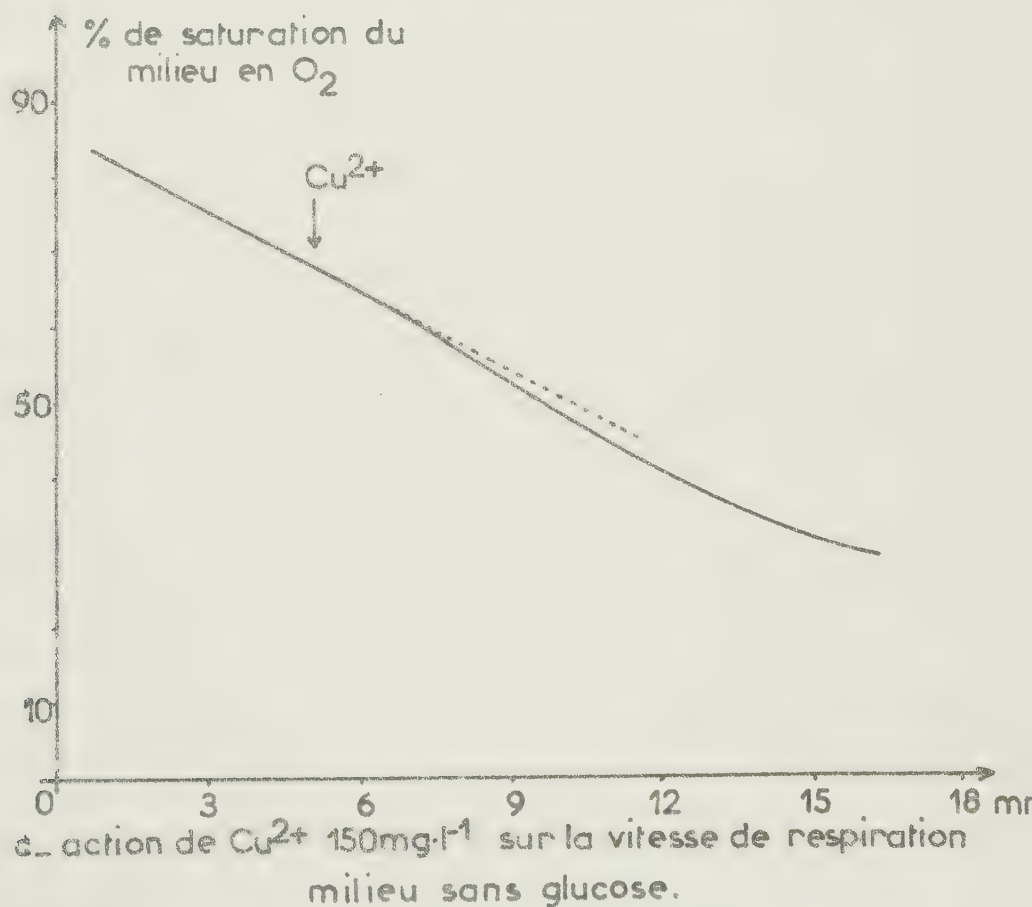
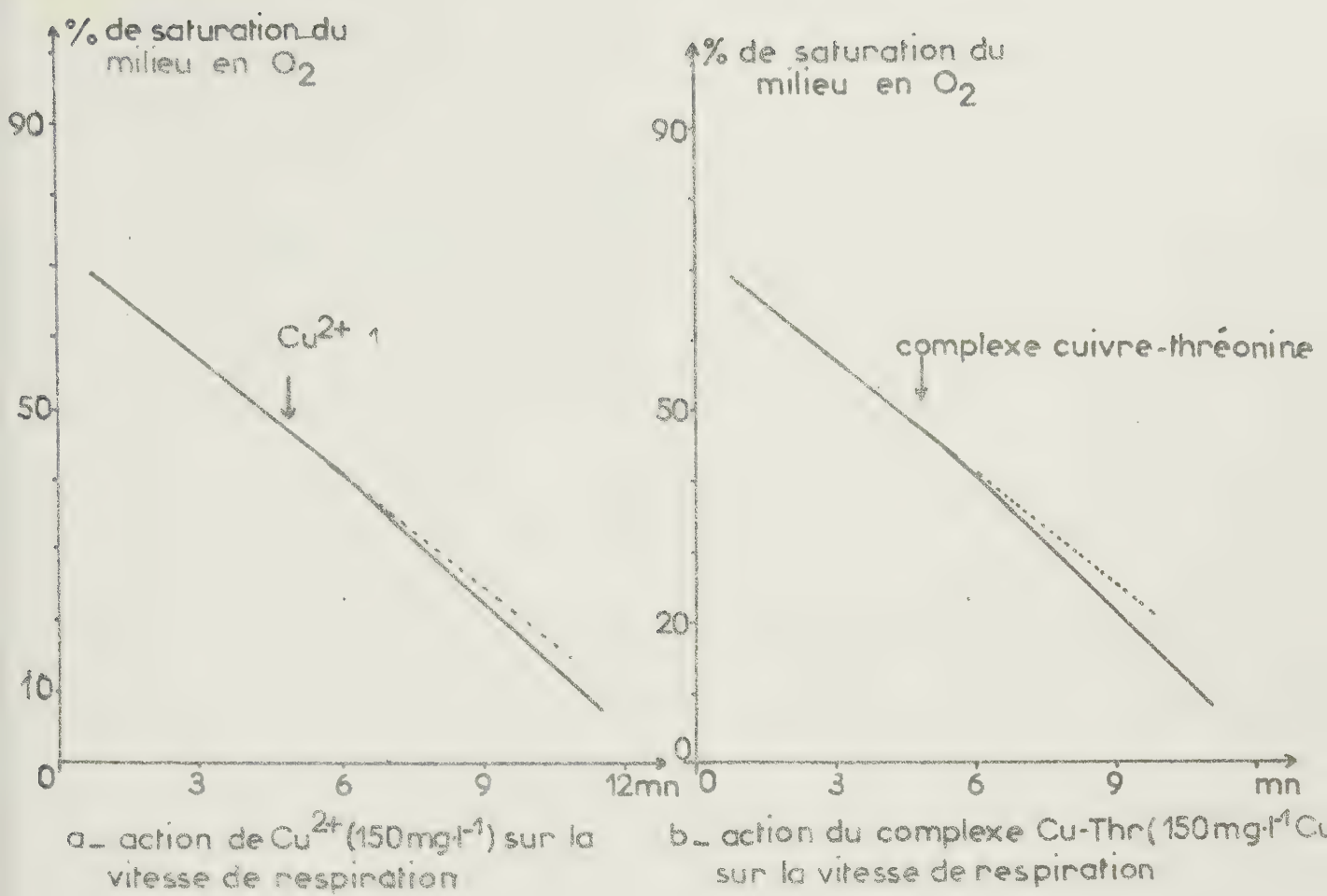


Fig. 33_ Etude de la respiration d'A. niger par mesure polarographique de la teneur en oxygène.

	Témoin (ml)	Essai (ml)
Tampon phosphate 0,3 M ; pH 7,0	1,0	1,0
MgSO ₄ (0,5 M)	0,1	0,1
KCN (0,1 M)	0,2	0,2
HCl 5% v/v	0,1	0,1
DCI ($1,7 \times 10^{-3}$ M)	0,2	0,2
Eau distillée	4,0	3,8
Suspension de mitochondries	0	0,2

Après 15 à 20 minutes de réaction (temps rigoureusement mesuré) on centrifuge à 20 000 g pendant 4 minutes pour éliminer le trouble dû à la suspension de mitochondries.

Les lectures se font au spectrocolumètre à 625 nm. Pour pouvoir comparer les différentes mesures, on ramène tous les résultats obtenus à une même teneur en protéines. Celles-ci sont dosées par la méthode du Biuret en ajoutant au préalable à chaque échantillon 0,5 ml de déoxycholate de Na à 10%.

Pour cette étude , le mycélium entier est mis en suspension pendant un temps minimum de 2 heures dans du milieu de Watson, contenant ou non du glucose, avec ou sans cuivre. Les mitochondries sont ensuite extraites, normalement, selon la méthode décrite dans "Matériel et Méthodes".

Résultats :

Les différentes courbes de la figure 34 permettent d'illustrer les résultats obtenus.

On remarque, qu'en absence de cuivre, l'activité succino--deshydrogénasique des mitochondries n'est pas affectée par la présence ou non du glucose dans le milieu de culture (courbes 1 et 2). Par contre, si en présence de glucose et de cuivre (courbe 3) l'activité enzymatique étudiée n'est que très faiblement inhibée (environ 15%), elle l'est nettement plus (plus de 50%) en présence de cuivre et en absence de glucose (courbe 4).

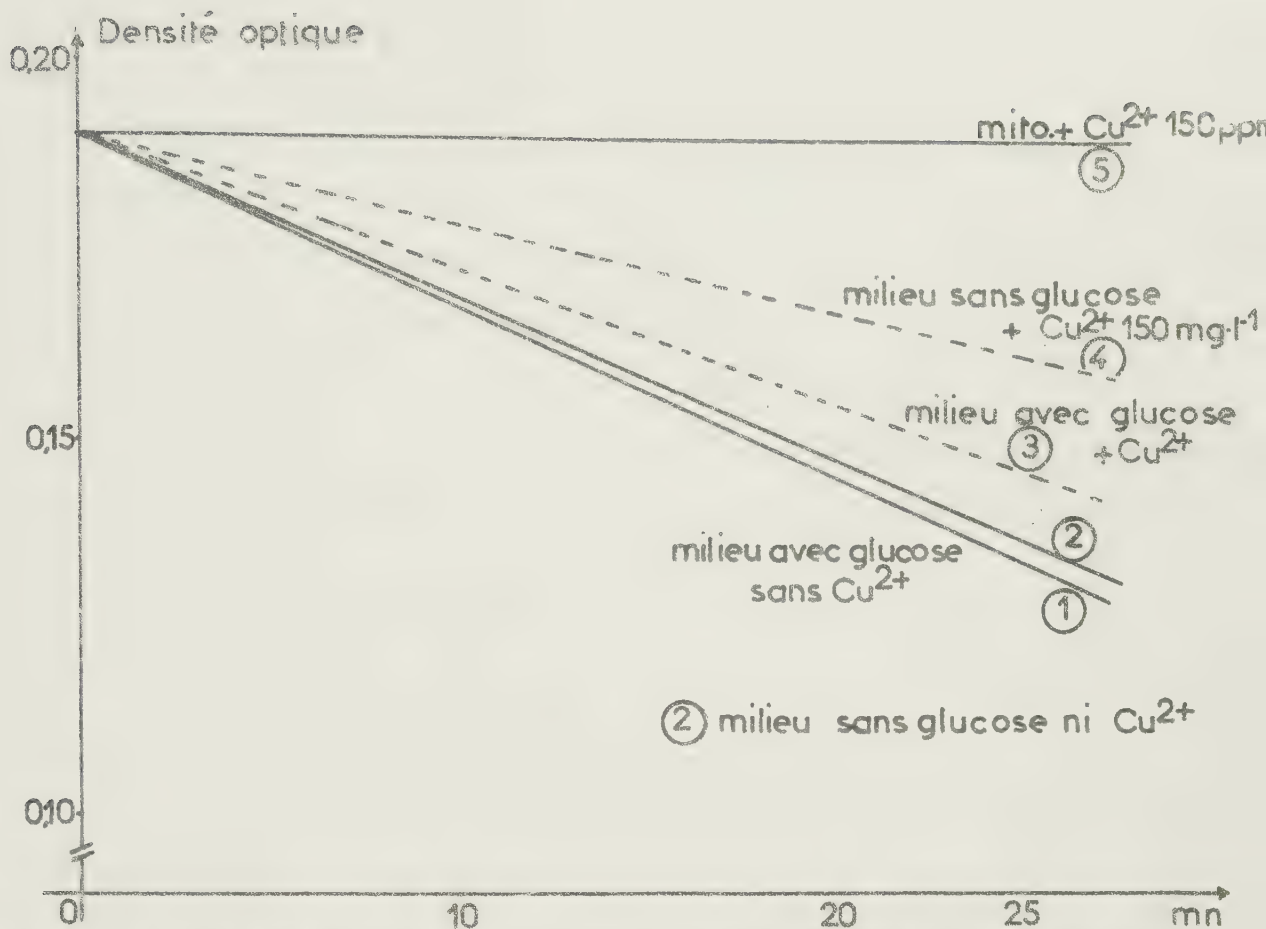


Fig.34 - Etude de l'activité succinodeshydrogénasique des suspensions de mitochondries d'A.niger.

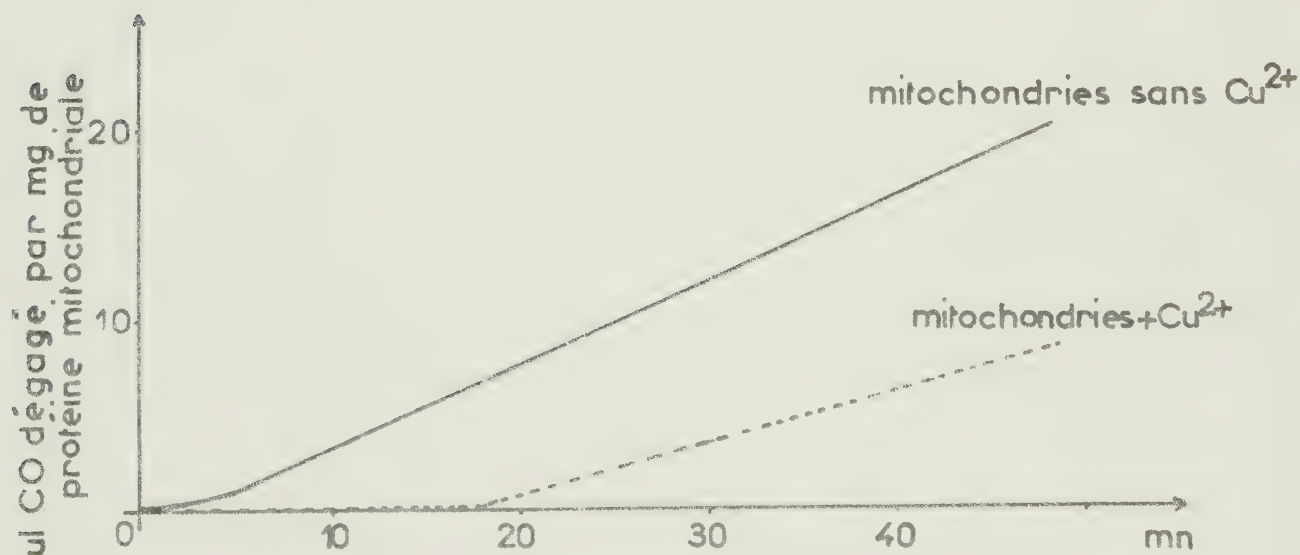


Fig.35. Activité respiratoire des mitochondries d'A.niger

D'autre part la courbe 5 (cuivre ajouté directement au milieu réactionnel) montre une inhibition totale de l'activité succino-deshydrogénasique, tout au long de l'expérience.

On peut en déduire que le glucose protège réellement le mycélium de l'action inhibitrice du cuivre.

En revanche l'essai n°5 ne peut pas nous permettre de conclure à l'inhibition totale de la respiration mitochondriale, c'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de la respiration des mitochondries.

III-1-5-b - Etude de la respiration des mitochondries.

Les méthodes d'extraction et le milieu réactionnel ont été décrits au chapitre "Matériel et Méthodes".

Il s'agit ici de déterminer quelle est l'action du cuivre sur le processus respiratoire des mitochondries.

Remarque : Cette étude mettant en jeu le cuivre, nous avons éliminé des milieux d'extraction et du milieu réactionnel tous les séquestrants des métaux lourds, soit pour nos expériences l'EDTA et la sérum-albumine.

Les résultats obtenus sont exprimés par la figure 35.

On remarque tout d'abord, que l'activité respiratoire en présence de cuivre est complètement inhibée pendant un certain temps (environ 20 minutes dans le cas observé). Puis cette inhibition disparaît presque totalement et on observe alors une respiration, plus lente qu'en absence de cuivre, mais nettement significative.

En définitive, on peut penser que, comme dans le cas de la mesure de l'activité succino-deshydrogénasique, dans un premier temps le cuivre libre inhibe la respiration, mais que cette inhibition n'est pas irréversible et que la fixation du cuivre sur certains sites peut entraîner la levée de cette inhibition.

Remarquons qu'il aurait été utile de poursuivre ces essais avec des concentrations en cuivre inférieures à 150 mg.l^{-1} , ce que nous

n'avons pas pu faire, faute de temps.

III-2- Influence du cuivre sur l'utilisation du glucose.

III-2-1 - Bilan du glucose

Nous venons en effet de voir que le cuivre pénètre dans les cellules de mycélium d'A. niger. Il était donc intéressant de savoir si l'utilisation du glucose par le mycélium avait été modifiée. Dans ce but, nous avons déterminé: la consommation du glucose entre le début et la fin de l'expérience (2 heures), la teneur en glucose endogène ainsi que le CO₂ rejeté. Les dosages ont été effectués par la méthode enzymatique décrite plus haut.

Ces expériences montrent que la quantité de glucose consommé est plus importante en présence de cuivre : $17,6 \times 10^{-4}$ mg de carbone consommé sous forme de glucose par mg de mycélium sec et par minute, contre $11,5 \times 10^{-4}$ mg de carbone en absence de cuivre.

Cette augmentation de la consommation de glucose est accompagnée, comme nous l'avons vu, d'une augmentation du rejet de CO₂.

En effet, en absence de cuivre $0,85 \times 10^{-4}$ mg de carbone sont rejetés sous forme de CO₂ par mg de mycélium sec et par minute, au lieu de $1,4 \times 10^{-4}$ mg en présence de cuivre.

Cette différence, si importante qu'elle soit, n'explique pas à elle seule des consommations de glucose aussi diverses. Pour tenter de résoudre ce problème nous avons déterminé les teneurs en glucose endogène par une technique de microdosage enzymatique.

Après déprotéinisation de l'extrait cellulaire, on observe une faible accumulation de glucose endogène : $8,1 \times 10^{-4}$ mg de carbone par mg de mycélium sec en présence de cuivre au lieu de $7,0 \times 10^{-4}$ mg de carbone par mg de mycélium sec en absence de cuivre; ces quantités sont cependant négligeables si on les compare aux quantités de glucose transformé pendant la même période.

Si nous observons simultanément l'accroissement de la quantité de glucose métabolisé en présence ou en absence de cuivre et la quantité correspondante de CO_2 respiré, pendant le même temps, nous sommes amenés à dire que la présence de cuivre active les processus de dégradation et de synthèse; à moins qu'il ne s'agisse d'une formation de produits de réserve.

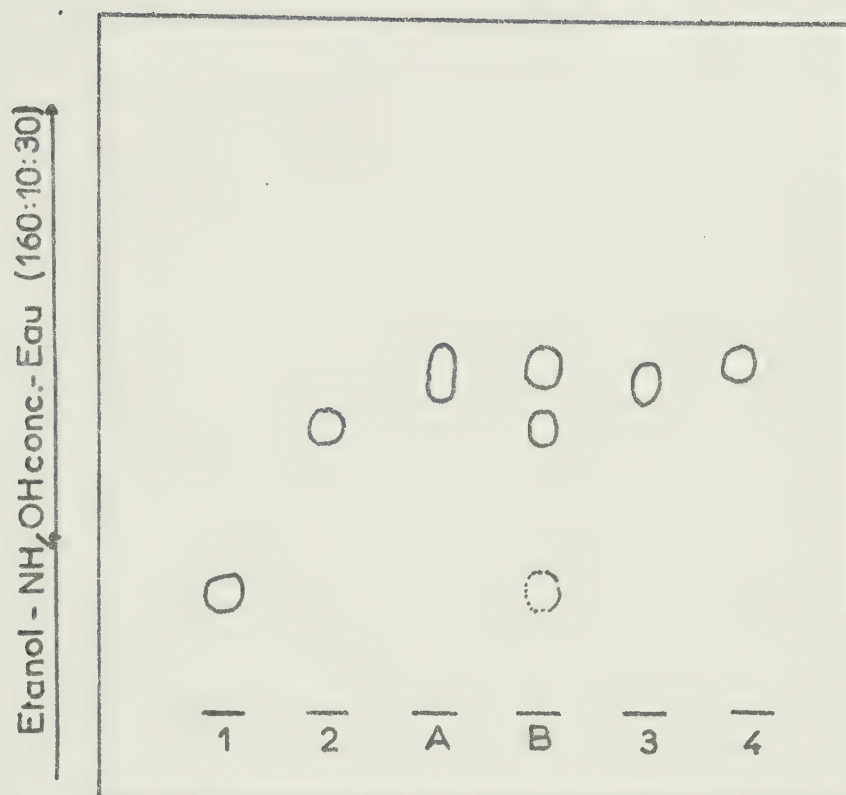
III-2-2 - Influence du cuivre sur la formation d'acides carboxyliques.

Il est reconnu que le cuivre exerce un effet favorable sur l'accumulation d'acide citrique excrété dans des cultures d'A.niger (20). Cet effet est surtout sensible lorsque le milieu de culture est enrichi en source carbonée (saccharose, mélasses,...) et appauvri en azote. On pouvait donc se demander si l'action du cuivre était la même dans un milieu de croissance normal tel que le milieu de Watson. Dans l'affirmative il devrait exister une relation entre la quantité de glucose métabolisé en présence de Cu et la quantité d'acide citrique produit.

Nous n'avons pas tenté d'établir cette relation et nous nous sommes contentés de comparer par chromatographie sur papier et sur couche mince les quantités d'acide citrique et isocitrique formés respectivement en présence et en absence de cuivre. Nous avons donc été amenés à analyser le contenu en acides carboxyliques du milieu de culture en présence et en absence de cuivre.

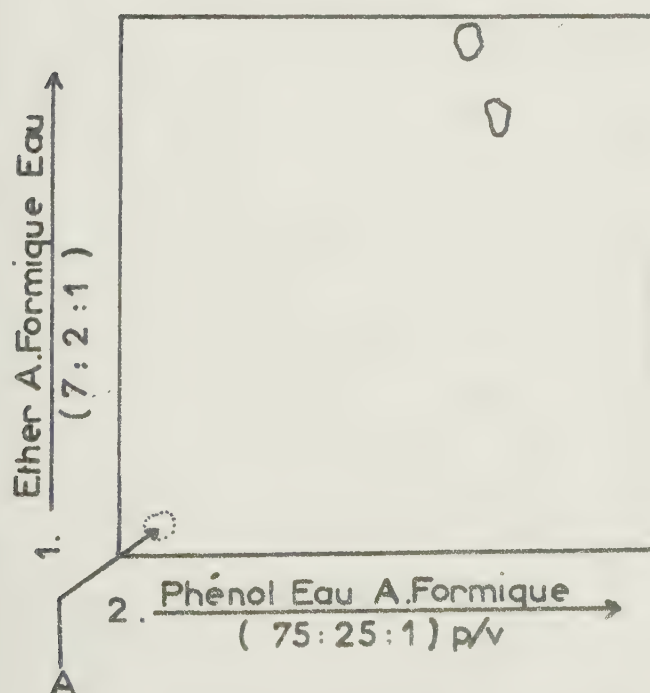
La chromatographie sur papier (Fig. 5a et 36a) montre qu'en l'absence de cuivre en fin de phase exponentielle, le mycélium n'a encore libéré que les acides succinique et fumarique. Ce résultat a été confirmé par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince (Fig. 5b et 36b).

En revanche, en présence de cuivre (250 mg.l^{-1} , sous forme de sulfate), on observe nettement la présence d'acide fumarique, celle d'acide succinique est moins certaine; de plus il y a exsorption d'acides isocitrique et citrique qui constituent la preuve de la modification



a.-Chromatographie sur papier Whatman n°1

b.-Chromatographie sur couche mince de cellulose.



1. Citrate
2. Isocitrate
3. Succinate
4. Fumarate

Ac. carboxyliques extraits du	dépôts	Identification
milieu sans cuivre	A	3 - 4
milieu avec cuivre 200ppm	B	3 - 2 - 1 - (4)

Fig.36 - Identification des acides carboxyliques excrétés dans le milieu de culture.

du métabolisme d'A.niger par le cuivre.

Ce résultat ne doit pas nous surprendre. On sait, en effet, que l'aconitase est activée par la présence d'ions Fe^{++} (82) et qu'elle est inhibée par un excès de Mn^{++} et de Cu^{++} qui entraînent l'accumulation d'acide citrique.

La pénétration du cuivre et son action sur le métabolisme étant établies il est intéressant de rechercher de quelle manière s'exerce cette activité.

III-3 - Relation entre la pénétration du cuivre dans le mycélium et l'activité ATPasique membranaire.

En étudiant l'influence d'un certain nombre d'inhibiteurs métaboliques, notamment du 2-4 dinitrophénol sur le transport des ions cuivriques, nous avons pensé qu'il pouvait exister une relation entre le transport du cuivre et l'activité des ATPases membranaires.

III-3-1 - Influence d'inhibiteurs métaboliques sur la pénétration du cuivre dans le mycélium d'A.niger

Nous avons utilisé pour cette étude trois inhibiteurs :

- le chloramphénicol, inhibiteur de la synthèse protéique au niveau de la traduction ;
- l'azoture de sodium (NaN_3), inhibiteur de la chaîne des cytochromes et en particulier du cytochrome a_3 ;
- le 2-4 dinitrophénol (2-4 DNP), inhibiteur de la phosphorylation oxydative.

Pour l'ensemble de ces expériences, nous avons opéré avec une concentration en cuivre, sous forme ionique ou complexée, de $150mg.l^{-1}$ de milieu.

III-3-1-1 - Cas du cuivre ionique

a) Chloramphénicol

Il s'agissait de savoir qu'elle pouvait être l'influence d'un blocage de la biosynthèse des protéines sur la pénétration du cuivre dans le mycélium d'A.niger. Nous avons utilisé l'inhibiteur à raison

de 100 μ g par ml (83).

Les résultats sont matérialisés par la courbe 2 de la figure 37.

On remarque immédiatement que les quantités de Cu fixées, en présence et en absence d'inhibiteur, ne varient pas de façon significative, on peut donc penser que le transport et l'accumulation du cuivre ne font pas appel à des structures protéiques nouvelles, mais à des structures déjà existantes.

b) Azoture de sodium.

Cet inhibiteur de la respiration est utilisé à la concentration de 1×10^{-3} M préconisée par LESTER et coll. (84) et GUPTA (85) pour bloquer le processus respiratoire respectivement de Neurospora crassa et de Arthrobotrys conoïdes. Nous avons vérifié à l'Oxygraphe Gilson que cette concentration est suffisante pour bloquer la respiration d'A.niger.

Les résultats de cette expérience sont exprimés par la courbe 3 de la figure 37. Cette courbe montre que la fixation du cuivre est beaucoup plus importante en présence de l'inhibiteur ; ici encore se manifestent les deux étapes déjà décrites : la première, d'une durée de l'ordre de 5 minutes est caractérisée par la pénétration d'une quantité notable de cuivre, et la seconde au cours de laquelle la fixation se poursuit à une vitesse lente mais non nulle. En l'absence d'inhibiteur la quantité de cuivre fixée à l'équilibre, au bout de 2 heures, atteint 0,55 μ g de Cu par mg de mycélium sec au lieu de 3,6 μ g en présence de NaN_3 .

c). 2-4 dinitrophénol

Nous avons opéré comme précédemment avec une concentration de 4×10^{-4} M de DNP (84).

La courbe 4 de la figure 37 a une allure identique à celle obtenue avec le NaN_3 . Cependant la quantité de Cu fixée par le mycélium est un peu plus faible (2,2 μ g de Cu fixé à l'équilibre contre 3,6 dans le cas de NaN_3).

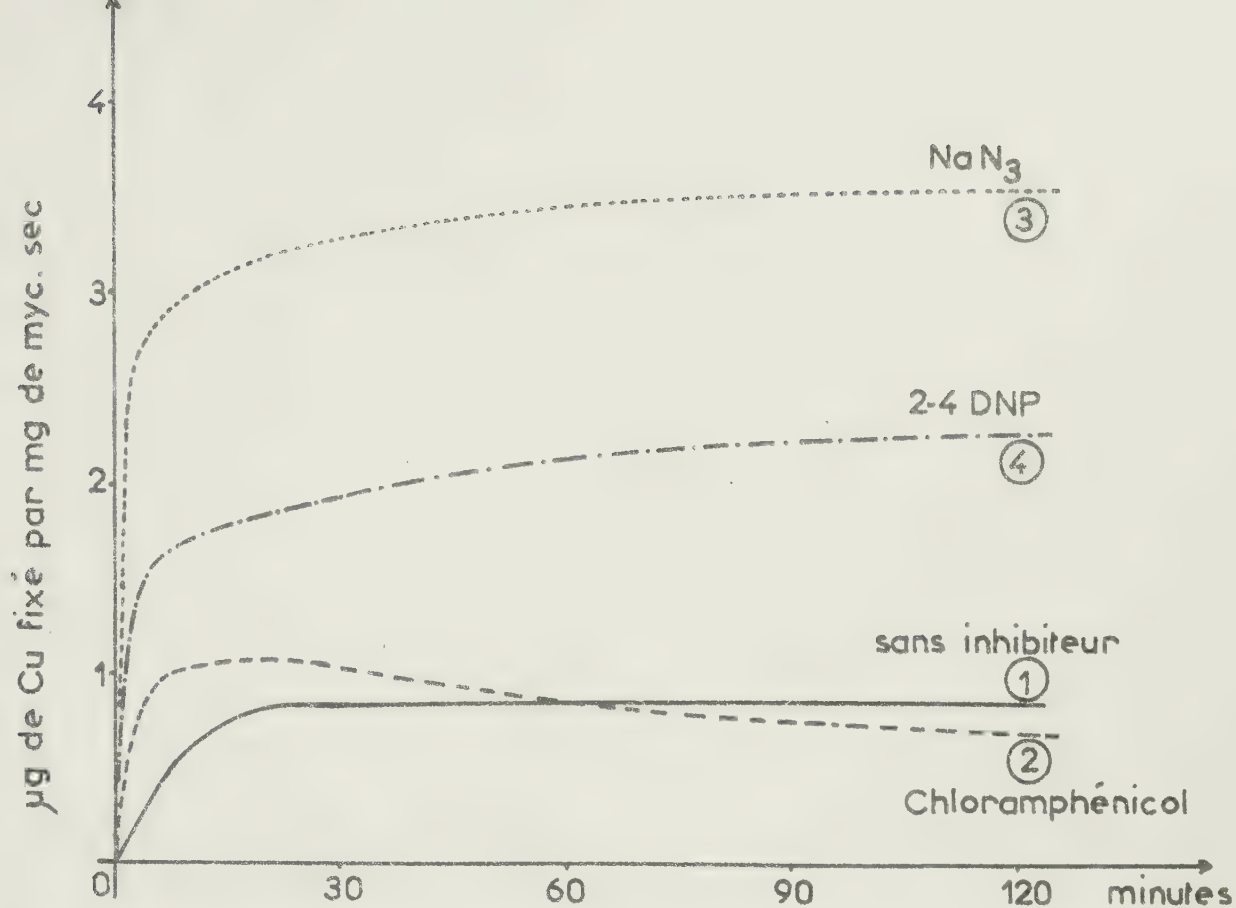


Fig. 37_ Influence des inhibiteurs sur l'absorption du cuivre ionique ($150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$)

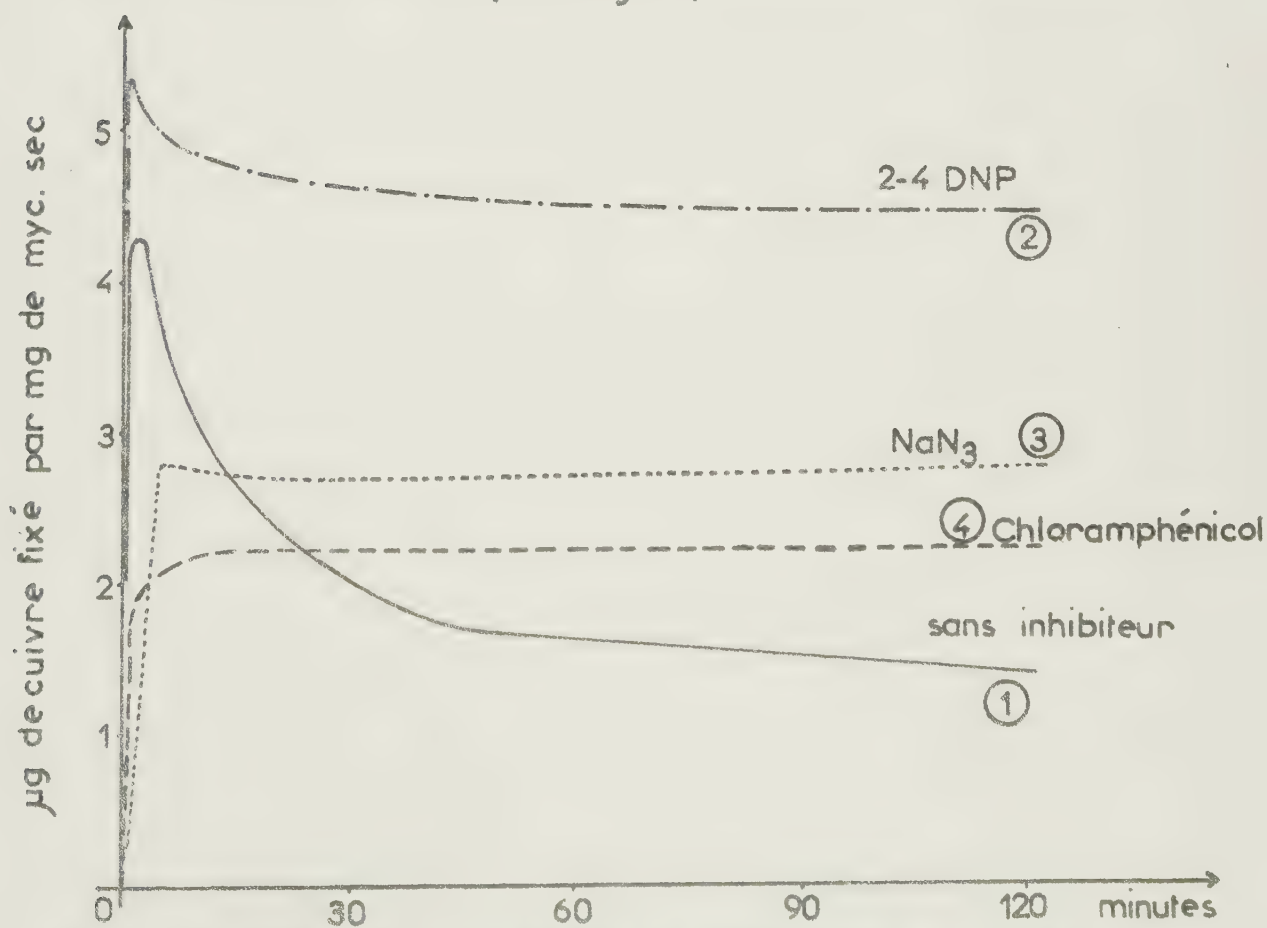


Fig. 38 _ Influence des inhibiteurs sur l'absorption du cuivre sous forme de complexe Cu-Thr ($150 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cu)

Ainsi, alors qu'en utilisant ces inhibiteurs nous attendions un abaissement de la teneur en Cu fixé par le mycélium, nous observons au contraire un accroissement significatif de cette valeur.

Il semble donc raisonnable de penser que les deux inhibiteurs (DNP et NaN_3) agissent de la même manière sur le processus de pénétration, en agissant sur le système respiratoire et sur les processus de phosphorylation oxydative. L'absence d'inhibition de la pénétration du cuivre ionique dans le mycélium par NaN_3 et DNP tend à montrer que ce processus n'est pas un transport actif consommateur d'énergie chimique.

Cependant on remarque que le 2-4 DNP, qui entraîne le découplage de la phosphorylation oxydative en augmentant l'activité des ATPases, provoque l'hydrolyse de l'ATP avec accroissement de la teneur en ADP et en orthophosphates. Ces observations nous ont conduit à penser que les systèmes ATPasiques jouent un rôle dans le processus de pénétration du cuivre dans la cellule.

Rappelons ici que les ATPases sont souvent reconnues responsables du transport des cations mono ou bivalents (14-15-53-54-55)

III-3-1-2 .. Cas du cuivre complexé.

Pour cette étude nous avons opéré dans les mêmes conditions expérimentales que pour le cuivre ionique.

Les courbes de la figure 38 traduisent la fixation par le mycélium du cuivre complexé en présence des différents inhibiteurs: 2-4 DNP, NaN_3 , Chloramphénicol.

a) 2-4 dinitrophénol.

Nous avons vu que le DNP inhibait à 50% le transport de la thréonine dans la cellule d'*A.niger* (cf "Résultats", chapitre II-2-2)

On pouvait donc penser que le DNP modifiait le processus de pénétration du cuivre sous forme complexée, comme c'est le cas pour certains processus de co-transport qui associent le transport des acides aminés et des ions Na^+ (40-86).

On obtient la courbe 2 de la figure 38 qui montre, contrairement à toute attente, que le processus d'entrée rapide du cuivre dans le mycélium n'est ni favorisé, ni inhibé; en revanche, le processus d'exsorption est pratiquement inexistant. Ce résultat tend à montrer que le processus de sortie du cuivre, intéressant le compartiment B (Fig. 21), est étroitement lié à un processus métabolique.

b) Azoture de sodium (courbe 3-Fig.38)

On observe ici un comportement différent du mycélium vis à vis du cuivre. Au cours de la phase rapide de pénétration, la quantité de cuivre fixée est beaucoup plus faible qu'en l'absence d'inhibiteur; la phase d'exsorption est, de plus, totalement inexistante. Tout se passe ici comme si la fixation du cuivre ne concerne plus que le compartiment cellulaire A, les propriétés du compartiment B étant totalement modifiées: la fixation du cuivre y est peu importante et l'exsorption nulle.

c) Chloramphénicol (Figure 38 -courbe 4)

Le comportement du mycélium est exactement le même qu'avec l'azoture de sodium. La quantité de cuivre fixé à l'équilibre est également plus faible.

III-3-2 - Influence des inhibiteurs des ATPases sur la pénétration du cuivre dans le mycélium d'A.niger.

Comme nous venons de le voir, il y a tout lieu de penser que les ATPases interviennent dans le transport du cuivre. Nous avons cherché à mettre en évidence ce phénomène en utilisant des inhibiteurs de ces ATPases. Il existe un certain nombre d'inhibiteurs, parmi lesquels l'ouabaine et l'oligomycine, fréquemment utilisés (76-37-38-39-90).

Nous avons utilisé ici séparément ces deux substances car elles peuvent inhiber des fractions différentes présentant une activité ATPasique (Ouabaine : 10^{-3} M ; Oligomycine : 50 mg par mg de protéines).

Les résultats obtenus ont été transcrits sur les figures 39 et 40. Dans le cas de l'ouabaine (Fig. 39), on observe une inhibition importante

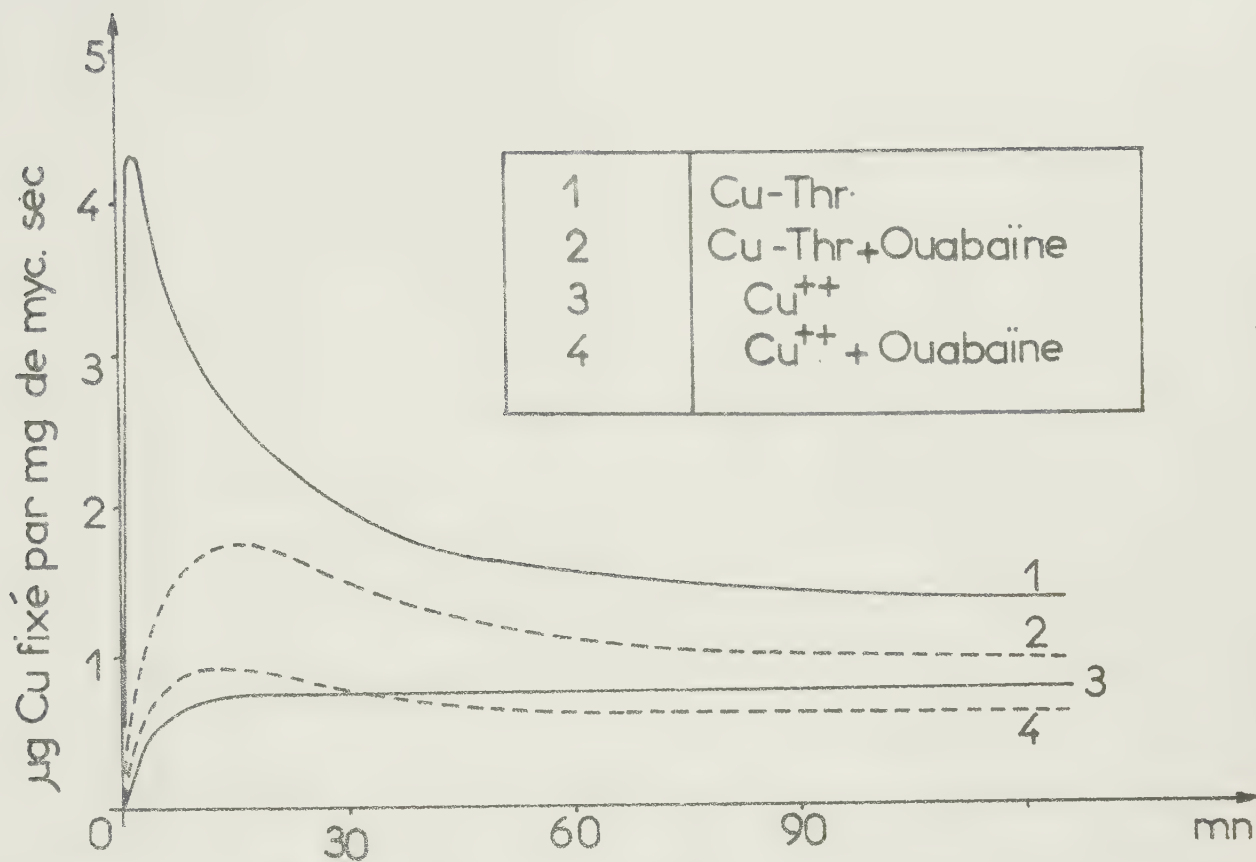


Fig.39. Influence de l'ouabaine sur l'absorption du Cu (150mg.l⁻¹)

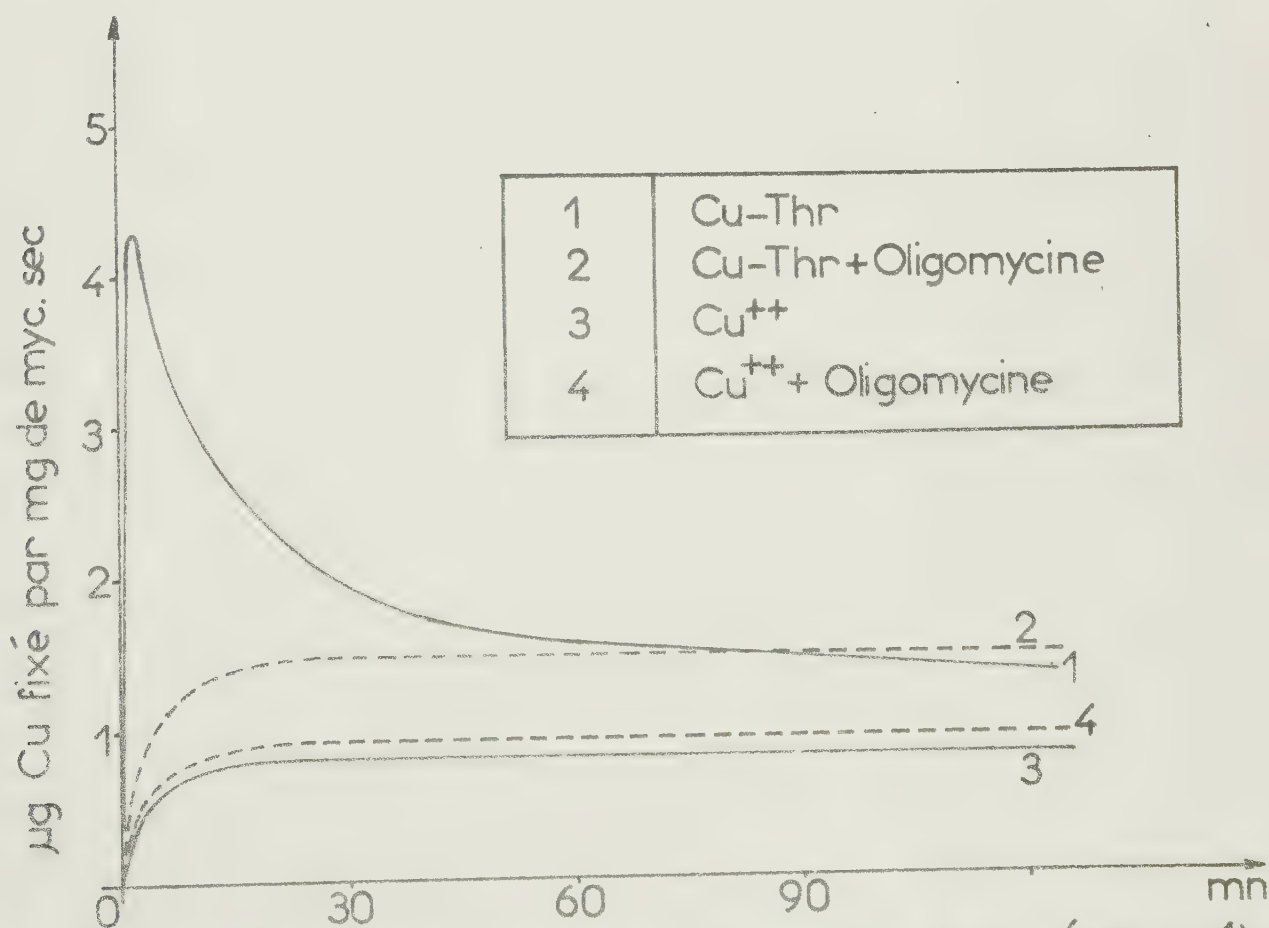


Fig.40 Influence de l'oligomycine sur l'absorption du Cu (150mg.l⁻¹)

de l'entrée du cuivre. Dans le cas du cuivre complexé, la phase rapide d'entrée est presque totalement inhibée, alors que la deuxième phase présente un taux d'inhibition de l'ordre de 30%. On retrouve ce même taux dans le cas du cuivre ionique.

Dans le cas de l'oligomycine (Fig. 40) l'inhibition semble totale pour la phase rapide mais très faible pour la deuxième phase, et ceci pour le cuivre complexé. En revanche l'entrée du cuivre ionique ne semble que peu affectée par l'oligomycine. Il semble donc que ce cas ressemble beaucoup à celui de l'utilisation de NaN_3 (pour le complexe), mais cela ne doit pas nous étonner car l'oligomycine, comme l'ouabaine, est aussi un découpleur de la phosphorylation oxydative.

Cependant, et en particulier lors de l'utilisation de l'ouabaine, l'emploi de ces substances provoque une inhibition différente de celle des simples inhibiteurs métaboliques.

En conclusion il semble que l'on puisse affirmer que l'activité ATPasique est en rapport direct avec l'entrée du cuivre dans le mycélium d'*A.niger*. Il n'est pas impossible de penser que le cuivre se fixe sur un des sites, normalement occupé par d'autres ions, tels que Mn^{++} ou Ca^{++} , dans le cas où ces ions servent d'activateurs de l'activité ATPasique.

Il était donc intéressant de vérifier quel était l'effet des composés cuivrés sur un extrait membranaire d'*A.niger*.

III-3-3 - Effets de différents composés cuivrés sur un extrait membranaire d'*A.niger*.

Il s'agit ici de vérifier si les hypothèses, émises précédemment, sont compatibles avec la réalité, et en particulier si les composés cuivrés utilisés lors de cette étude ne sont pas incompatibles avec une activité ATPasique.

L'extraction des ATPases membranaires ainsi que la mesure de l'activité ATPasique ont été décrites dans la partie "Matériel et Méthodes" de notre travail.

Le tableau suivant donne les différentes activités obtenues, en prenant pour base 100 : l'activité mesurée en absence de cuivre.

Substances ajoutées	Activité ATPasique
Néant	100
Cu^{++}	27
Complexe Thr-Cu-Thr	40
Cu^{++} + 2-4 DNP	40
Thr-Cu-Thr + 2-4 DNP	80

Ces résultats correspondent assez exactement aux résultats obtenus lors des manipulations sur la pénétration du cuivre. En effet le taux de fixation du cuivre sous forme ionique, et en absence de thréonine, est bien le plus faible de tous les taux observés. En revanche on note une augmentation du taux de fixation quand le cuivre est associé à la thréonine et quand le cuivre ionique est en présence de 2-4 DNP.

Ainsi donc, cette manipulation nous montre que, si l'activité ATPasique semble inhibée par le cuivre, l'utilisation de "substances" provoquant normalement une augmentation de l'activité de ces systèmes enzymatiques entraîne bien une augmentation de l'activité étudiée.

Il semble donc qu'on puisse faire le rapport entre cette activité ATPasique et le transport du cuivre. Cependant un certain nombre d'investigations supplémentaires seront nécessaires pour déterminer les conditions de cette activité des ATPases lors du transport du cuivre.

DISCUSSION et CONCLUSION

Contrairement à toute attente, nous avons donc montré que le cuivre dans le domaine des concentrations étudiées, et en présence de glucose, est très peu toxique pour le champignon; par contre il entraîne une modification notoire de son processus de croissance ce qui indique qu'il ne s'agit pas purement et simplement d'une séquestration du cuivre par certains constituants cellulaires métaboliquement inactifs.

Les expériences d'absorption en présence de cuivre ionique nous ont fait penser à un processus diffusionnel, mais ce mécanisme est compliqué par l'étude de la désorption qui n'obéit pas à une loi de simple diffusion.

Cette hypothèse est également soutenue par les études du transport du complexe thréonine-cuivre. En effet les courbes obtenues font immédiatement penser à un phénomène de diffusion d'échange ou de contre-transport du cuivre. D'après un certain nombre d'auteurs, KEPES (28), KOCH (92), WONG, WILSON et WINKLER (93-94), ce mécanisme n'est cependant possible que lorsque le processus de transport est soumis à une inhibition compétitive qui bloque l'efflux du substrat qui a traversé la membrane, entraînant ainsi son accumulation contre un gradient de concentration. Lorsque la concentration en substrat atteint une valeur limite qui dépend de sa concentration dans le milieu extérieur, on assiste à une inversion du phénomène, avec traversée de la membrane en sens inverse et retour à l'équilibre des concentrations du milieu extérieur et du compartiment interne, que l'on peut expliquer par l'établissement d'un processus de diffusion simple. Pour justifier cette hypothèse, on peut invoquer, au terme de l'accumulation temporaire du substrat, une dissociation du complexe transporteur-substrat.

Ce schéma s'applique parfaitement au cas du transport du cuivre et de la thréonine au travers de la membrane cellulaire d'*A.niger*.

Nous avons vu en effet que le complexe thréonine-cuivre se dissocie avant

l'entrée dans la cellule. On peut donc supposer que le cuivre libéré se fixe sur un transporteur qui va lui permettre de traverser la membrane.

On peut penser, d'autre part, que ce transporteur est le même pour la thréonine et le cuivre. Dès lors, on peut expliquer comment la fixation de Cu a la possibilité d'entraîner une modification de l'affinité du transporteur pour la thréonine.

Les courbes de la figure 22 permettent dans une certaine mesure de justifier cette hypothèse. En effet la courbe n°2 fait apparaître brusquement, au niveau du point de rebroussement, un accroissement notable de la vitesse d'absorption de la thréonine qui coïncide avec une diminution caractéristique de la teneur en cuivre, après son accumulation temporaire, au moment du retour à l'équilibre avec le milieu extérieur.

Réciproquement, il est logique de penser que la thréonine modifie l'affinité du transporteur pour le cuivre ce qui se traduit momentanément par une inhibition de l'efflux du cuivre.

Rappelons aussi qu'à teneur en cuivre constante, la hauteur du pic d'accumulation temporaire du cuivre est d'autant plus importante que le rapport Cu/Thr est élevé.

On retrouve pour l'essentiel cette inhibition de l'efflux du cuivre dans le cas de l'étude de sa pénétration en présence de thréonine et d'un inhibiteur du métabolisme énergétique, le 2-4 dinitrophénol (2-4 DNP). Les résultats obtenus (Fig. 38) en présence de 2-4 DNP tendent à montrer que la pénétration du cuivre n'est pas sous la dépendance du métabolisme énergétique. Il faut rappeler, en effet, qu'à la concentration utilisée ($4 \times 10^{-4} M$) cet inhibiteur bloque l'activité respiratoire, tandis que la vitesse de pénétration de la thréonine est réduite de moitié (cf "Résultats" chapitre II-2-1). D'autre part, on observe une inhibition importante de la phase de sortie du cuivre qui accompagne le passage au maximum d'accumulation temporaire (Fig. 38). Cette étape que nous avons qualifiée de diffusionnelle, dans le cas du complexe transporteur-thréonine-cuivre, est très affaiblie en présence de 2-4 DNP. Dans ces conditions, il est permis de penser que la dissociation du

complexe transporteur-thréonine-cuivre est inhibée par le 2-4 DNP.

Ce comportement est encore plus accusé dans le cas où l'on remplace le 2-4 DNP par l'azoture de Na (NaN_3). En effet, dans ces conditions la phase "diffusionnelle" est complètement supprimée, ce qui se traduit vraisemblablement par un blocage ou une inhibition complète de la dissociation du complexe transporteur-thréonine-cuivre. Donc, paradoxalement, tout se passe comme si des inhibiteurs du métabolisme énergétique intervenaient directement dans l'inhibition du processus diffusionnel (de sortie) du cuivre, dans le cas où la pénétration de cet élément est sous la dépendance d'un acide aminé tel que la thréonine. D'autre part, cette inhibition a pour effet de provoquer une accumulation en cuivre bien supérieure à l'accumulation normale, et ceci en présence ou non de thréonine; si ce mécanisme était retrouvé pour d'autres champignons parasites, on peut penser que l'action toxique du cuivre pourrait être considérablement potentialisée par la présence de tels inhibiteurs.

Nous avons vu cependant que l'addition au milieu de cuivre, ionique ou associé à la thréonine, provoquait une nette accélération du processus respiratoire du champignon. Ceci aurait pu nous faire penser à une relation directe entre le transport du cuivre et le métabolisme énergétique. Cependant les inhibiteurs du métabolisme respiratoire, à la concentration utilisée, bloquent totalement la respiration et le métabolisme énergétique, ce qui prouve une fois encore que la pénétration du cuivre seul et en présence de Thr n'est pas sous la dépendance du métabolisme énergétique. En particulier pour le cas du complexe Thr-Cu, nous avons affaire à un processus de contre-transport qui met en jeu l'existence d'un transporteur mixte, ou de deux transporteurs, possédant des sites saturables par le Cu et l'acide aminé.

On aurait pu penser aussi que l'entrée de la thréonine, qui est en partie sous la dépendance d'un processus de transport actif, était couplée au transport du cuivre. Nous avons cependant écarté cette hypothèse, puisque l'utilisation du DNP se traduit par une diminution du métabolisme énergétique mais aussi par une augmentation substantielle de la fixation du cuivre dans

le mycélium. Ceci tend bien à confirmer le rôle spécifique du DNP dans l'inhibition de la dissociation du complexe transporteur-thréonine-cuivre.

Au contraire, en présence d'ouabaine et d'oligomycine (Fig. 39 et 40), on note l'absence significative du pic d'accumulation temporaire du cuivre, ce qui tend à confirmer que, dans ces cas là, l'inhibition de l'efflux de cet élément par la thréonine est levée; la disparition de la phase d'entrée rapide a pour effet de supprimer forcément le processus de diffusion qui l'accompagne.

On peut se demander dès lors, comme pour le 2-4 DNP et le NaN_3 , si l'action de ces inhibiteurs ne se situe pas aussi au niveau du transporteur en modifiant l'affinité de ce dernier pour la thréonine. Dans ces conditions, la quantité de cuivre accumulé tend vers une valeur voisine de celle que l'on aurait en absence de l'acide aminé (Fig. 39).

Sachant que l'ouabaine est un inhibiteur des ATPases (37) et que le 2-4 DNP est au contraire un activateur de ces enzymes, il était intéressant de savoir dans quelle mesure l'action de l'ouabaine et du DNP était liée à la manifestation de cette activité.

En effet, on admet à l'heure actuelle que les ATPases ($\text{Na}^+ + \text{K}^+ + \text{Mg}^{++}$) interviennent dans le transport actif des cations $\text{Na}^+, \text{K}^+, \dots$ tandis que le complexe $\text{ATPase} \cdot \text{Mg}^{++}$ contrôle dans certains cas la perméabilité passive des neurones et des érythrocytes (14-94). D'autre part, le cuivre Cu^{++} est capable de modifier l'activité ATPasique dans le sens de l'activation ou dans le sens de l'inhibition selon les concentrations utilisées. C'est pourquoi, pour tenter de justifier l'intervention possible des systèmes ATPasiques dans le ou les processus de transport du cuivre au travers de la membrane d'*A.niger*, nous avons isolé un extrait membranaire et avons comparé les activités ATPasiques en présence de différentes combinaisons cuivriques (Cu^{++} , Thr-Cu-Thr, en présence ou non de 2-4 DNP). Nous nous sommes bornés à l'étude de cet inhibiteur à cause de son influence remarquable sur l'accumulation du cuivre qui accompagne la phase de pénétration rapide.

Les résultats obtenus tendent à montrer que, pour le système extrait

membranaire-Cu-Thr-2,4 DNP, l'activité ATPasique est la plus élevée ; tandis que pour le même système sans DNP, . elle est 2 fois moins importante.

Ces résultats suggèrent que la phase de pénétration rapide du cuivre, dépendante de l'inhibition du processus d'efflux par la thréonine, est indépendante de l'activité ATPasique. Au contraire, l'étape de diffusion qui lui succède est vraisemblablement liée à l'activité phosphohydrolasique des ATPases.

Toutefois il est difficile d'exclure complètement, dans l'état actuel de notre recherche, la participation éventuelle de phospholipides et de systèmes phosphatasiques qui pourrait interférer avec la formation de phosphates imputables à l'activité ATPasique.

En résumé, les résultats obtenus au cours de ce travail tendent à montrer que la pénétration du cuivre ionique au travers de la membrane d'A.niger, s'effectue par l'intermédiaire d'un processus de diffusion compliqué par une accumulation de cet élément au niveau de certaines structures cellulaires. Le cuivre accumulé n'est pas échangeable avec le magnésium. En présence d'un amino-acide (thréonine), le transfert du cuivre est considérablement modifié, et se traduit par un processus de diffusion d'échange ou de contre-transport.

Avec l'aide des inhibiteurs (2-4 DNP, NaN_3 , Ouabaine,...), nous avons pu discerner les étapes de ce processus qui est indépendant du métabolisme énergétique et qui est lié à l'existence d'un transporteur mixte pour la thréonine et pour le cuivre.

L'influence du cuivre, seul ou en association avec la thréonine et le 2-4DNP, sur l'activité ATPasique membranaire tend à montrer que ces enzymes interviennent dans le transport non actif de cet élément, vraisemblablement dans l'étape diffusionnelle du contre-transport.

Il n'est pas inutile enfin de souligner tout l'intérêt que présente pour la phytopathologie la potentialisation de l'activité fongicide du cuivre en présence de divers inhibiteurs du métabolisme énergétique.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - STEINBERG R.A.
Effect of trace elements on growth of A.niger with amino-acids.
J. of Agric. Research., (1942), 64 ,n°8, p 455 - 475
- 2 - LILLY V.G.
Chemical constituents of the fungal cell. "The fungi-An advanced treatise" Vol.1, Chap.2, p 163-177 . Academic Press (1965) New-York.
- 3 - LAVOLLAY J.
Rapport sur les courbes de récoltes d'A.niger en fonction de la teneur en éléments nutritifs. Carences, toxicités, interactions.
Bull. Soc. Franç. Physio. Vég., (1959), 5, n°2, p 29-45.
- 4 - MULDER E.G.
Influence of copper on growth of microorganisms. Ann. Ferm., (1938), 4, p 513-533
- 5 - FLING M., HOROWITZ N.H. et HEINEMANN S.F.
The isolation and properties of cristalline tyrosinase from Neurospora. J. Biol. Chem., (1963), 238 , p 2045-2053.
- 6 - MOSBACH R.
Purification and some properties of laccase from Polyporus versicolor . Biochim. Biophys. Acta , (1963) , 73 , p 204-212.
- 7 - BYRDE R.J.W.
The chemical environnement for fungal growth. "The fungi-An advanced treatise" Vol.1, Chap.20, p 525-541. Academic Press (1965), New-York.
- 8 - LEFEVRE P.G.
Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across human red cell membrane. J. of Gen. Physiol., (1948), 31, p 505-527.
- 9 - VILLEGAS R. et VILLEGAS C.M.
The endoneurium cells of the squid giant nerve and their permeability to ¹⁴C-glycerol. Biochim. Biophys. Acta, (1962), 60, 202-204.
- 10 - KOEFOED-JOHNSEN V. et USSING H.H.
The nature of the frog skin potential. Acta Physiol. Scand., (1958), 42 , p 298-303.

- 11 - CHIARANDINI D.J., STEFANI E. et GERSCHENFELD H.M.
Inhibition of membrane permeability to chloride by copper in molluscan neurones. *Nature (London)*, (1967), 213, n°5071, p 97-99.
- 12 - VERITY M.A. et GAMBELL J.K.
Studies of copper ion-induced mitochondrial swelling in vitro. *Biochem. J.*, (1968), 108, p 289-295.
- 13 - PETERS R. et WALSHE J.M.
Studies on the toxicity of copper. I - The toxic action of copper in vivo and in vitro. *Proc. Roy. Soc. London ser. Biol.*, (1966), 166, p 273-284.
- 14 - BOWLER K. et DUNCAN C.J.
The effect of copper on membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, (1970), 196, p 116-119.
- 15 - BOWLER K. et DUNCAN C.J.
Evidence implicating a membrane ATPase in the control of passive permeability of excitable cells. *J. Cell. Physiol.*, (1967), 70, 121-130.
- 16 - BARFIELD G., SOMMERFIELD P., MEYN T., HOLBY M., BABCOOK D., BRADLEY D. et SEGEL I.H.
Regulation of sulfate transport in filamentous fungi. *Plant Physiol.*, (1970), 46, p 720-727.
- 17 - ROVEL B.
Etude de la perméation des ions Cu^{2+} chez *A.niger*; leur influence sur la biosynthèse des acides carboxyliques. Diplôme d'Etudes Approfondies-Biochimie- (1970) Université de NANCY.
- 18 - PARMENTIER Y.
Contribution à l'étude du transport du cuivre dans un champignon filamenteux. Diplôme d'Etudes Approfondies-Biochimie- (1971) Université de NANCY.
- 19 - JURKOWSKA H.
The adaptation of *A.niger* to copper. *Acta Microb. Polon.*, (1952), 1, n°2, p 107-122.
- 20 - SCHWEIGER L.B.
Process for the production of citric acid. U.S. Patent (1961) N° 2.970.084 .
- 21 - ANTOINE A.
Effets des ions cuivriques sur la levure. I - Actions des ions Cu^{2+} sur l'utilisation du glucose, des réserves et de l'acétate. *Biochim. Biophys. Acta*, (1963), 74, p 351-358.

22 · KOTYK A.

Effect of metal ions on monosaccharide transport in baker's yeast.
Proceedings of the second symposium on Yeasts. Bratislava ,
(1968), p 451-455.

23 · GRENSON M.

Le transport des métabolites, en particulier des acides aminés,
à travers les membranes cellulaires. Rev. Ferm. Indust. Alim.,
(1967), 22 , p 7-20.

24 · DIVIES C. et MORFAUX J.N.

Perméabilités des levures aux sucres et aux acides aminés.
Ann. Techn. Agric., (1968), 17 , n°4, p 355-377.

25 · CIRILLO V.P.

Sugar transport in microorganisms. Ann. Rev. Microbiol., (1961),
15 , p 197-218.

26 · WILKINS P.O.

Arabinose counter-transport in baker's yeast. J. of Bacteriol.,
(1967), 93 , n°5, p 1565-1570.

27 · VANSTEVENINK J., WEED R.I. et ROTHSTEIN A.

Localization of erythrocyte membrane sulphhydryl groups essen-
-tial for glucose transport.
J. Gen. Physiol., (1965), 48 , p 617-632.

28 · KEPES A.

Etudes cinétiques sur la galactoside perméase d'E.coli.
Biochim. Biophys. Acta , (1960), 40 , p 70-84.

29 · WIDDAS W.F.

Facilitated transfer of hexoses across human erythrocyte membrane.
J. Physiol., (1954), 125 , p 163-180.

30 · MITCHELL P.

Phosphate transport across Staphylococcus aureus cell membrane.
J. Gen. Microb., (1954), 11 , p 73-79.

31 · PARDEE A.B., PRESTIDGE L.S., WHIPPLE M.B. et DREYFUSS J.

Binding site for sulfate and its relation to sulfate transport
into Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem., (1966), 241, p 3962-3969.

32 · PARDEE A.B.

Purification and properties of a sulfate-binding protein from
Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem., (1966), 241 , p 5886-5892.

33 - PARDEE A.B.

Cristallization of a sulfate binding protein (permease) from Salmonella typhimurium. Science, (1967), 156, p 1627-1628.

34 - KEPES A. et COHEN G.N.

Permeation - "Permeation in the bacteria" Chap.5, p 179-221
Academic Press (1962) New-York.

35 - LOWE A.G.

Enzyme mechanism for the active transport of sodium and potassium ion in animal cells. Nature, (1968), 219, n°5157, p 934-936.

36 - LORENZINI M.

L'exsorption de K^+ par des disques frais de pomme de terre: compartimentation, action du Ca^{2+} et du Mg^{2+} .
Physiol. Vég., (1970), 8, n°2, p 159-172.

37 - GOLDMAN D., SCHULTZ S.G. et EPSTEIN W.

Repressive control of potassium transport in Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta, (1966), 130, p 546-548.

38 - CRANE R.K., FORSTNER G. et EICHHOLZ A.

Studies on the mechanism of the intestinal absorption of sugars.
X - An effect of Na^+ concentration on the apparent Michaelis constants for intestinal sugar transport, in vitro.
Biochim. Biophys. Acta, (1965), 109, p 467-477.

39 - WHEELER K.P. et CHRISTENSEN H.N.

Role of Na^+ in the transport of amino-acids in rabbit red cells.
The J. of Biol. Chem., (1967), 242, n°7, p 1450-1457.

40 - KOSER B.H. et CHRISTENSEN H.N.

Effect of substrate structure on coupling ratio for Na^+ -dependent transport of amino acids. Biochim. Biophys. Acta, (1971), 241, p 9-19.

41 - ROTHSTEIN A.

Uptake - "The fungi - An advanced treatise" Vol.1, Chap.15, p 429-55
Academic Press (1965) New-York.

42 - ROTHSTEIN A. et HAYES A.D.

The relationship of the cell surface to metabolism. XIII - The cation-binding properties of yeast cell surface.
Arch. Biochem. Biophys., (1956), 63, p 87-89.

- 43 .. SILVER S.
Active transport of magnesium in *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., (1969), 62, n°3, p 764-771.
- 44 .. SILVER S., JOHNSEINE P. et KING K.
Manganese active transport in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol., (1970), 104, n°3, p 1299-1306.
- 45 .. BATTACHARYYA P.
Active transport of manganese in isolated membranes of *E. coli*.
J. Bacteriol., (1970), 104, n°3, p 1307-1311.
- 46 .. WEBB M.
Interrelationships between the utilization of magnesium and the uptake of other bivalent cations by bacteria.
Biochim. Biophys. Acta, (1970), 222, p 428-439.
- 47 .. JENNINGS D., HOOPER D.C. et ROTHSTEIN A.
The participation of phosphate in the formation of a carrier for the transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} ions into yeast cells.
J. Gen. Physiol., (1958), 41, p 1019-1026.
- 48 .. ROTHSTEIN A., HAYES A., JENNINGS D. et HOOPER D.
The active transport of Mg^{2+} and Mn^{2+} into the yeast cell.
J. Gen. Physiol., (1958), 41, p 585-594.
- 49 .. VASINGTON F.D. et MURPHY J.V.
 Ca^{2+} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. J. Biol. Chem., (1962), 237, n°3, p 2670-2677.
- 50 .. WALLING M.W. et ROTHMAN S.S.
Phosphate independant, carrier mediated active transport of calcium by rat intestine. Amer. J. Physiol., (1969), 217, p 1144-3.
- 51 .. FUHRMANN G.F. et ROTHSTEIN A.
The transport of Zn^{2+} , Co^{2+} and Ni^{2+} into yeast cells.
Biochim. Biophys. Acta, (1968), 163, p 325-330.
- 52 .. MAKINOSE M.
The phosphorylation of the membranal protein of sarcoplasmic vesicles during active calcium transport.
Eur. J. Biochem., (1969), 10, p 74-82.
- 53 .. SKOU J.C.
Enzymatic basis for active transport of Na^{+} and K^{+} across cell membrane. Physiol. Rev., (1965), 45, p 596-617.

54 - SKOU J.C.

The role of the phosphorylated intermediate in the reaction of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ activated enzyme system. "Membrane bound enzymes" p 175-193 - Edited by: Porcellati and Di Jeso-Plenum Press (1971).

55 - DIETZE G. et HEPP K.D.

Calcium stimulated ATPase of cardiac sarcolemma. Biochem. Biophys. Res. Com., (1971), 44, n°5, p 1041-1049.

56 - STEIN W.D.

"The movement of molecules across cell membranes" Edited by Stein W.D.- pp369- Academic Press -(1967) -New-York.

57 - TRIP J.A., QUE G.S., BOTTERWEG-SPAN Y. et MANDEMA E.

The state of copper in human lymph. Clin. Chim. Acta, (1969), 26, p 371-372.

58 - OWEN J.C.A. et ORVIS A.L.

Release of copper by rat liver. Amer. J. Physiol., (1970), 218, n°1, p 88-91.

59 - HARRIS D.I.M. et SASS KORTSAK A.

The influence of amino acids on copper uptake by rat liver slices. J. Clin. Invest., (1967), 46, n°4, p 659-667.

60 - RUBIN M., SLIWINSKI A., PHOTIAS M., FELDMAN M. et ZVAIFLER N.

Influence of chelation on gold metabolism in rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1967), 124, n°1, p 290-296.

61 - HELBOCK H.J. et SALTMAN P.

The transport of iron on rat intestine. Biochim. Biophys. Acta, (1967), 135, p 979-990.

62 - SZILAGYI G. et ERSLEV A.J.

Effect of organic iron compounds on the iron uptake of reticulo-cytes in vitro. J. Lab. Clin. Med., (1970), 75, n°2, p 275-282.

63 - LARKIN E.C., WEINTRAUB L.R. et CROSBY W.H.

Iron transport across rabbit allantoic placenta. Amer. J. Physiol., (1970), 218, n°1, p 7-11.

64 - PRESSMANN B.C., HARRIS E.J., JAGGER W.S. et JOHNSON J.H.

Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., (1967), 58, p 1949-1956.

65 - NEUMANN P.Z. et SILVERBERG M.

Active copper transport in mammalian tissues. A possible role in Wilson's disease. Nature(London), (1966), 210, n°5034, p 414-416.

66 - SASS-KORTSAK A. et HARRIS D.I.M.

Copper transport in mammalian tissues. *Nature*, (1966), 211, p 852-3.

67 - WATSON K. et SMITH J.E.

Oxydative phosphorylation and respiratory control in mitochondria from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.*, (1967), 104, p 332-339.

68 - TRINCI A.P.J.

A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*, (1969), 57, p 11-24.

69 - MANDELS G.R.

Kinetics of fungal growth. "The fungi-An advanced treatise" Vol.1 Chap. 25, p 599-612 - Academic Press (1965) New-York.

70 - OHNISHI T., KAWAGUSHI K. et HAGIHARA B.

Preparation and some properties of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, (1966), 241, n°8, p 1797-1806.

71 - LOWRY O.H. et LOPEZ J.A.

The determination of inorganic phosphate in the présence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, (1946), 162, p421-428.

72 - CHEFTEL R.I., MUNIER R. et MACHEBOEUF M.

Microchromatographie sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils - II - *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (1952) 34, 380-7.

73 - MYERS W.F. et HUANG K.Y.

Thin layer chromatography of citric acid compounds. "Methods in enzymology" Vol. XIII-Chap. 64, p 431-434 - Academic Press (1969) New-York.

74 - WATSON K. et SMITH J.E.

Respiratory components of *Aspergillus niger* mitochondria. *J. Bacteriol.*, (1968), 96, p 1546-1550.

75 - DETTMER D., GLANDER H.J. et MULLER F.

Effect of monosaccharides on the sodium activation curve of the intestinal ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 266, p 128-132.

76 - ATKINSON A. et LOWE A.G.

The pH dependence of the effects of Na^+ , K^+ and ouabain on the ATPase activity of NaI-treated brain microsomes with Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} et Zn^{++} as divalent metal activators. *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 266, p 128-132.

77 - SARKAR B. et KRUCK T.D.A.

"The biochemistry of copper" p 183-196 Ed. Preisach J., Aisen P. et Blumberg W.E. - Academic Press (1966) New-York.

78 - MALDONADO P., RICHAUD C., AUNE J.P. et METZGER J.

Méthode de synthèse de la thréonine et étude physico-chimique des intermédiaires. Bull. Soc. Chim., (1971), 8, p 2933-2938.

79 - BRAUNS G. et LONTIE R.

Etude de l'hydrolyse partielle de l'hémocyanine d'Helix pomatia. Arch. Intern. Physiol. Biochim., (1960), 68, p 211-212.

80 - SINGER S.J. et NICOLSON G.L.

The structure and chemistry of mammalian cell membranes. Amer. J. Pathol., (1971), 65, p 427-435.

81 - ZONNEVELD B.J.M.

Biochemical analysis of the cell wall of Aspergillus nidulans. Biochim. Biophys. Acta, (1971), 249, p 506-514.

82 - WILLIAMSON J.R. et CORKEY B.E.

Assays of intermediates of citric acid cycle and related compounds by fluorimetric enzyme methods. "Methods in Enzymology" Vol. XIII Chap. 65, p 434-513. Academic Press (1969) New-York

83 - RING K.

Die Induktion des aktiven Transports neutrales Amino-säuren bei Streptomyces hydrogenans. Biochim. Biophys. Acta, (1969), 183, p 375-93.

84 - LESTER G., AZZENA D. et HECHTER O.

Permeability and metabolism of lactose in Neurospora crassa. J. Bacteriol., (1962), 84, p 217-227.

85 - GUPTA R.K. et PRAMER D.

Amino-acid transport by the filamentous fungus Arthrobotrys conoides. J. Bacteriol., (1970), 103, p 120-130.

86 - CHRISTENSEN H.N., THOMAS E.L. et HANDLOGTEN M.E.

Features of amino-acid structure enhancing or obstructing cosubstrate reactivity of Na^+ in transport. Biochim. Biophys. Acta, (1969), 193, p 228-230.

87 - AKERA T.

Quantitative aspects of the interaction between ouabain and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase in vitro. Biochim. Biophys. Acta, (1971), 249, p 53-62.

88 - CHAMBERS D.A., SALZMAN E.W. et NERI L.L.

Characterization of "Ecto-ATPase" of human blood platelets. Arch. Biochem. Biophys., (1967), 119, p 173-178.

- 89 -- LARDY H.A., JOHNSON D. et Mc MURRAY W.C.

Antibiotics as tools for metabolic studies : A survey of toxic antibiotics in respiratory, phosphorylative and glycolytic systems. Arch. Biochem. Biophys., (1958), 78 ,p 587-597.

- 90 -- TZAGOLOFF A., BYINGTON K.H. et Mc LENNAN D.H.

The isolation and characterisation of an oligomycin sensitive adenosine phosphatase from bovine mitochondria. J. Biol. Chem., (1968), 243 ,p 2405-2412.

- 91 -- KOCH A.L.

The role of permease in transport. Biochim. Biophys. Acta , (1964), 79 ,p 177-200.

- 92 -- WINKLER H.H. et WILSON T.H.

The role of energy coupling in the transport of galactosides by E.coli . J. Biol. Chem., (1966), 241 ,p 2200-2211.

- 93 -- WONG P.T.S. et WILSON T.H.

Counterflow of galactosides in E.coli . Biochim. Biophys. Acta , (1970), 196 ,p 336-350.

- 94 -- SCHATZMANN H.J. et ROSSI G.L.

(Ca^{++} + Mg^{++}) activated membrane ATPase in human red cells and their possible relations to cations transport. Biochim. Biophys. Acta , (1971), 241 ,p 379-392.

B. ROVEL

Thèse de Docteur-Ingénieur

Vu, approuvé
et permis d'imprimer

NANCY, le 28 JUIN 1974

Le Président de l'Université de NANCY I

J.R. HELLUY

